MEMORIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

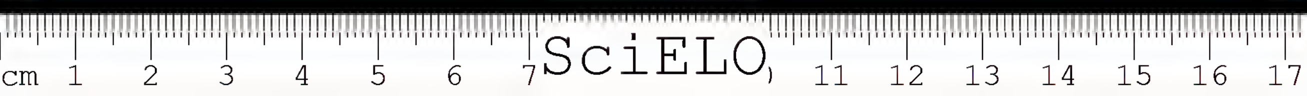
1937

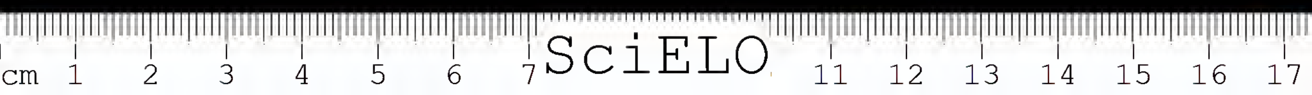
TOMO XI

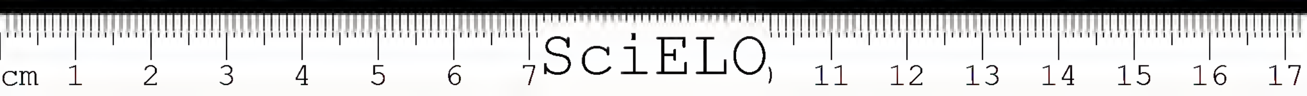


São Paulo, Brasil
Caixa postal 65




SciELO


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17


cm 1 2 3 4 5 6 7 SciELO 11 12 13 14 15 16 17

MEMORIAS

DO

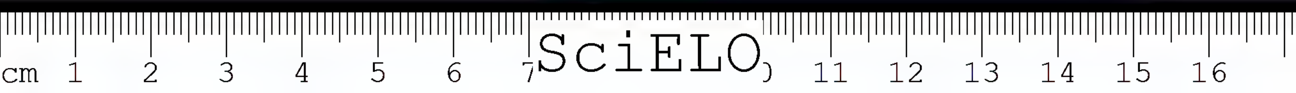
INSTITUTO BUTANTAN

1937

TOMO XI



São Paulo, Brasil
Caixa postal 65




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

INDICE

NOTICIARIO

No Noticiario do tomo VI destas Memorias foram publicadas as linhas geraes da reorganização scientifica por que havia passado o Instituto Butantan, que, desde abril de 1931, se vem transformando em um centro de estudos biologicos, dedicando-se, no dominio da medicina esperimental, especialmente a trabalhos sobre pathologia humana. No Noticiario do tomo IX foi dito que no Instituto já haviam sido criadas as ultimas secções technicas, previstas pela reorganização de 1931, tendo mesmo, entre estas, sido installada a de Chimica experimental.

Exprimiu-se nessa occasião a esperança de que, graças ao caracter moderno impresso por essa organização, poderia avultar a contribuição do Instituto ao progresso das sciencias biologicas em nosso meio. Dessa maneira, procurava-se tambem encarecer a necessidade de se incrementarem as pesquisas experimentaes, ao invés dos estudos de systematica tão em voga entre nós e tentava-se abrir caminho ás investigações originaes que em Butantan deveriam ser feitas sobre uma infinidade de problemas de natureza chimica. Em uma instituição que se dedica á biologia não é para admirar esse apreço pela chimica. Muito pelo contrario; pois a vida é, em si mesma, um problema chimico a variar de accordo com cada substracto physico-chimico.

E, pois, com especial agrado que neste tomo se annuncia a publicação de uma grande serie de trabalhos sobre chimica, a versarem uns sobre a natureza dos hormonios sexuaes, outros sobre a composição do café e outros, finalmente, sobre os principios constituintes dos venenos dos batrachios e dos ophidios. Esses estudos são ou serão completados pelas necessarias pesquisas no terreno da physiologia e da pharmacologia, podendo-se esperar que, opportunamente, terão elles a applicação pratica desejada.

Em outros artigos, são publicados novos estudos sobre a substancia hemocoagulante do veneno da Jararaca e sobre a possibilidade de concentração da antitoxina tetanica por adsorpção. Alem de algumas revisões sobre ophidios, surge ainda neste volume a primeira tentativa de systematização de todas as formas de lagartos registadas até hoje em nosso territorio e acompanhadas dos respectivos nomes vulgares.

Apparece, outrosim, a 2.ª edição das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica com todas as opiniões emittidas pela Commissão Internacional até o anno de 1935, epoca em que se reuniu em Lisboa o ultimo Congresso de Zoologia.

Entre os trabalhos de collaboração contam-se dois artigos do prof. Mello Leitão sobre opiliões e aranhas das collecções de Butantan e dois outros do prof. André Dreyfus sobre interessantes questões de biologia geral no terreno da reproducção.

Ao ser impresso o presente numero das "Memorias", é a seguinte a relação do pessoal technico superior das varias secções do Instituto Butantan:

Directoria e Secção de Ophiologia e Zoologia Medica:

Afranio do Amaral, B. Sc. & L., D. M., D. Hyg. (Med. Trop., Harvard), Editor das "Memorias do Instituto Butantan".

Secções de Immunologia Experimental e Sorotherapia e de Bacteriologia Experimental e Bacteriotherapia:

Paulo Artigas, B. Sc. & L., D. M. Prof. Fac. Pharm. Odont. S. Paulo.
Jandyra Planet, D. M.
Benedictus Mourão, D. M.
Ariosto Souto, D. M.

Secção de Virus e Virustherapia:

Joaquim Travassos, B. Sc. & L., D. M.

Secção de Physico-Chimica Experimental:

Dionysio von Klobusitzky, D. M. (Pécs), Ex-Priv. Doc. Chim.-Physiol., Univ. Pécs.
Paulo König, D. Phil. Chim. (Vienna).

Secção de Parasitologia e Protozoologia:

Flavio da Fonseca, D. M.

Secção de Botanica Medica (com Pharmacognosia):

M. Pirajá da Silva, D. M., Ex-Prof. Fac. Med. Bahia.

Secção de Chimica e Pharmacologia Experimentaes:

Carlos Slotta, D. Phil. Chim. (Breslau), Ex-Prof. Chimica, Univ. Breslau.
Geraldo Szyszka, D. Phil. Chim. (Breslau), Ex-Assist. Inst. Chim., Univ. Berlim.
Claudio Neisser, D. Phil. Chim. (Göttingen).
J. Ribeiro do Valle, D. M.

Secção de Physio-Pathologia (com Endocrinologia e Histopathologia):

Thales Martins, D. M. — Endocrinologia.
Moacyr Amorim, D. M. — Histopathologia.
Raul F. de Mello, D. M. — substituto.
Paulo R. de Souza, D. M. — interino.

Secção de Cyto-Embryologia e Genetica Experimental:

Gertrudes von Ubisch, D. Sc. (Estrasburgo), Ex.-Prof. Botanica (Genetica), Univ. Heidelberg.

Toda correspondencia scientifica, relativa ás "Memorias", deve ser dirigida ao

EDITOR, MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN
Caixa Postal 65
SÃO PAULO, BRASIL

612.4

SOBRE A CHIMICA DOS HORMONIOS SEXUAES

1. Estado actual da questão

POR

C. H. SLOTTA

Os hormonios são substancias que, produzidas pelas glandulas de secreção interna e transportadas pelo sangue, têm o poder de exercer effeitos physiologicos caracteristicos em outras partes do corpo.

Para o esclarecimento de cada effeito chimico, deve-se criar uma prova exacta, mas pouco complicada, com que se possa provar a dose de hormonio contida nas diversas fracções. Além disso, tendo de retirar quantidades infimas de substancia de volumes enormes de material glandular, o chimico deve estar habilitado a elaborar elevadas quantidades de material numa escala industrial, ou ter para esse fim uma fabrica que lhe forneça preparados já anteriormente purificados. Deve ainda dispór da capacidade e da possibilidade de effectuar trabalhos micro-chimicos com milligrammas de substancia extrahida, afim de conseguir o insulamento e o esclarecimento constitucional de cada hormonio. Si, finalmente, quizer dedicar-se á synthese desses principios, torna-se-lhe indispensavel possuir um conjuncto completo de conhecimentos e meios complementares de apparelhamento, como sómente se encontram em institutos de pesquisas chimicas de velha tradição ou de grande dotação orçamentaria.

Não é de estranhar, portanto, que dos 30 hormonios no minimo, entrevistos como producto de 11 glandulas endocrinas, só um pequeno numero delles tenha sido obtido em estado chimicamente puro. Com effeito, conhecemos, até hoje, sómente a constituição exacta de 5 hormonios e a approximada de dois outros, sendo que apenas quatro hormonios já são accessiveis á synthese industrial.

O seguinte quadro mostra-nos os hormonios de constituição chimica já esclarecida:

N.º	*Hormonio*	*Origem*	*Descobridor*	*Anno*
1	Adrenalina	Medulla da suprarenal	Stolz	1904
2	Thyroxina	Thyreoide	Harington	1926
3	Progesterona	Corpo amarello	Slotta	1934
4	Estradiol	Folliculo	Doisy	1935
5	Testosterona	Testiculo	Laqueur	1935
6	Adrenosterona	Cortice da suprarenal	Reichstein	1936
7	Corticosterona	Cortice da suprarenal	»	1937

Quanto ainda falta fazer! Sobre os hormonios da *glandula pineal*, da *parathyreoide* e do *thymo* não sabemos praticamente coisa alguma. Dos hormonios da *hypophyse*, provavelmente 15, apenas sabemos que consistem quasi todos de substancias proteinicas mais ou menos complicadas, ou seja uma classe de corpos que representa para a nossa chimica actual um terreno quasi intransponivel. Sobre a *insulina*, hormonio do *pancreas*, estamos igualmente pouco informados: já foi obtida crystallizada, mas a sua estructura ainda está longe de qualquer esclarecimento. Conhecemos melhor os hormonios da *suprarenal*: a adrenalina, hormonio da medulla, foi a primeira insulada em estado puro, analysada e synthetizada. No anno passado, foi insulada da cortice uma substancia, que tem influencia nitida sobre os caracteres sexuaes secundarios masculinos; foi chamada *adrenosterona*. Conclue-se dahi que, não só as glandulas genitaes produzem hormonios de acção sexual, mas tambem a suprarenal, cuja interferencia no caso até agora não se havia entrevisto. Ha poucos meses, soubemos que, após muito trabalho, foi insulado da cortice suprarenal um outro hormonio, este necessario á vida, e denominado *corticosterona*. Tambem o hormonio da glandula *thyreoide* já foi synthetizado; todavia, justamente neste caso ainda não foi dita a ultima palavra quanto ás relações entre o hormonio e as substancias que o acompanham.

Durante os ultimos oito annos, o esclarecimento dos *hormonios sexuaes* progrediu com uma rapidez admiravel. Em 1934 e 1935, os dois hormonios femininos e o hormonio sexual masculino foram insulados das respectivas glandulas e ficou esclarecida a sua constituição. Foram produzidos por synthese total ou por meia-synthese. Vemos dahi que, entre os annos de 1904 e 1926, não se verificou muito progresso, mas que os ultimos dez annos representam uma época nova e mais productiva neste terreno.

O esclarecimento relativamente rapido dos hormonios sexuaes explica-se pelos seguintes factos:

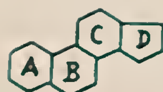
Primeiro: Por se haverem encontrado provas relativamente simples para seu conhecimento. Podem-se castrar animaes, isto é, extirpar-lhes as glandulas

sexuaes, sem que isto lhes traga a morte: esta, no entanto, sobrevem facilmente pela perda de outras grandulas de secreção interna. Conforme se injecte hormonio masculino ou hormonio feminino, apparecem certos phenomenos physiologicos nitidos, que podem servir de prova de especificidade.

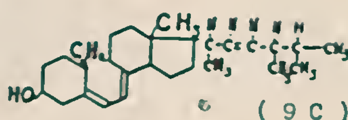
Em 1923, foi elaborada por Allen e Doisy a prova para o hormonio follicular, a qual é empregada até hoje sem grandes modificações: o camondongo femeo castrado entra de novo no estro com preparados de hormonio follicular, o que é pronunciadamente caracteristico pela descamação de cellulas epitheliaes anucleadas e cornificadas na vagina. Em 1929, foi indicado por Gallagher e Koch a prova "Gallo capão" para o hormonio do testiculo, e, no mesmo anno, Corner e Allen apresentaram a prova para o hormonio do corpo amarello. E' este o mais complicado, visto que a coelha deve ser castrada após o coito e tratada durante cinco dias consecutivos com hormonio de corpo amarello, antes que se possa, por uma operação subsequente, verificar a transformação, na mucosa do utero, da phase de proliferação para a phase de secreção, para assim se poder determinar a efficiencia do producto.

Segundo: Por pertencerem estes tres hormonios a uma classe de corpos, que foi explorada muito minuciosamente nos ultimos trinta annos, e cujo esqueleto estructural foi esclarecido definitiva e completamente em 1932. Refiro-me a substancias que possuem todas um nucleo cyclopentana-perhydro-phenantreno e que denominamos esteroides. A esta classe pertencem, além dos hormonios sexuaes, os esteroes (p. ex., a cholesterina), os acidos biliares (como o acido cholico) e os venenos cardiacos (como a digitoxina) e a vitamina D (Fig. 1).

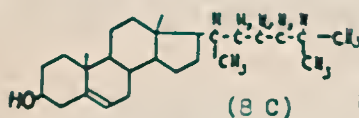
Alguns derivados de



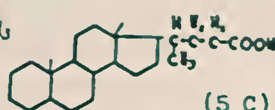
Cyclopentana-perhydro-phenanthreno



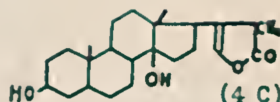
Vitamina D



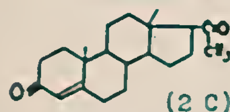
Cholesterina



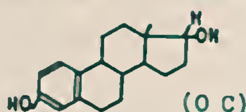
Acido cholanico



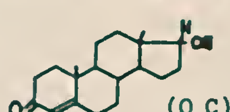
Digitoxigenina



Progesterona



Estradiol



Testosterona

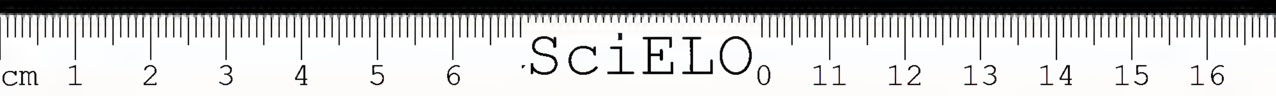
Além de certas variações no nucleo, pode-se notar á primeira vista que as cadeias lateraes dos esteroides possuem um comprimento muito differente, enquanto os hormonios sexuaes têm a cadeia lateral muito mais curta ou mesmo nenhuma. Sómente depois de se terem extrahido os hormonios puros das glandulas é que foi possivel applicar-lhes todos os conhecimentos que já se possuiam sobre os esteroides. Isso favoreceu o esclarecimento estructural e possibilitou tambem enfrentar a synthese dos hormonios, partindo de esteroes e acidos biliares facilmente accessiveis.

Terceiro: Pelo facto de já serem conhecidas antes do descobrimento dos hormonios gonadaes, i. é. dos principios retirados do folliculo, do corpo amarello e do testiculo, as substancias nas quaes elles são transformados pelo figado e pelos rins, e eliminados depois pela urina.

Essas substancias eliminadas pela urina podem ser usadas, como sabemos hoje, como materia prima para a synthese dos proprios hormonios *in vitro*. No fim da gravidez da mulher e do quinto ao oitavo mês da prenhez de eguas, p. ex., é eliminada com a urina uma substancia com dois atomos de hydrogenio a menos do que no hormonio follicular, substancia essa que na prova de Allen-Doisy ainda possue de 20 a 25 % da acção do hormonio verdadeiro. E' muito mais facil, naturalmente, insular-se uma substancia activa de um liquido aquoso como a urina, do que uma glandula, que contém gordura, proteinas e outras impurezas. Por este motivo nos foi apresentado, por Doisy em 1929 (1) e, logo depois, por Butenandt (2), o producto de desdobramento do hormonio follicular extrahido da urina. Esta substancia, a *estrona*, foi considerada durante 5 annos, o que é facil de comprehender, como sendo o proprio hormonio follicular. Ainda em 1929, foi encontrado na urina gravidica por G. F. Marrian, o producto de desdobramento do hormonio do corpo amarello (3), esclarecido posteriormente por Butenandt e denominado *pregnandiol* (4); esta substancia, todavia, por não possuir mais effeito physiologico, não conduziu ao erro de ser tomada por um hormonio.

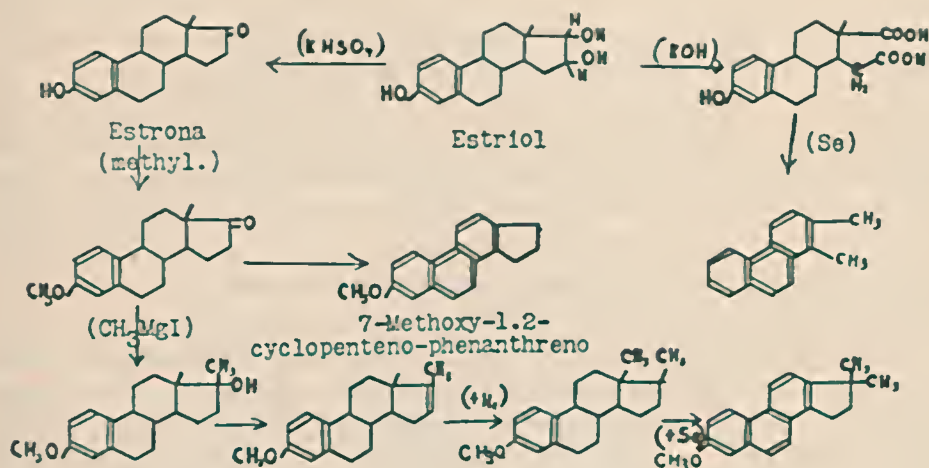
Sómente após o insulamento e esclarecimento da estrona e do pregnandiol tornou-se possivel a pesquisa chimica, seguida da synthese dos hormonios sexuaes femininos, dos quaes trataremos a seguir.

De 1000 litros de urina gravidica humana obtém-se, por extracção com dissolventes organicos, um gramma de *estrona* e de um a dois grammas de *pregnandiol*, enquanto a mesma quantidade de urina de eguas prenhes produz 20 grammas de estrona e uma pequena quantidade de substancias semelhantes sómente fracamente estrogenicas. O *pregnandiol*, até hoje, foi sómente extrahido da urina humana. Como a *estrona* possue um grupo phenolico, pode ser extrahida com benzol, alcool butylico ou chloroformio. Os extractos oleosos obtidos podem ser purificados por distribuição entre solventes immisciveis. Por



meio dos reactivos cetonicos obtém-se os respectivos derivados, dos quaes a *estrona* é recuperada em estado puro. Um gramma de *estrona* é capaz de provocar o estro em 8 a 10 milhões de camondongos castrados, enquanto um gramma da verdadeira *folliculina* ou *estradiol* pode provocar o estro em 30 a 50 milhões de camondongos castrados.

Pela transformação em hydrocarburetos syntheticamente accessiveis, de constituição já conhecida, pode-se provar que a *estrona*, o *pregnandiol* e tambem um outro producto insulado por Marrian, o *estriol*, têm o esqueleto dos esteroides (Fig. 2).

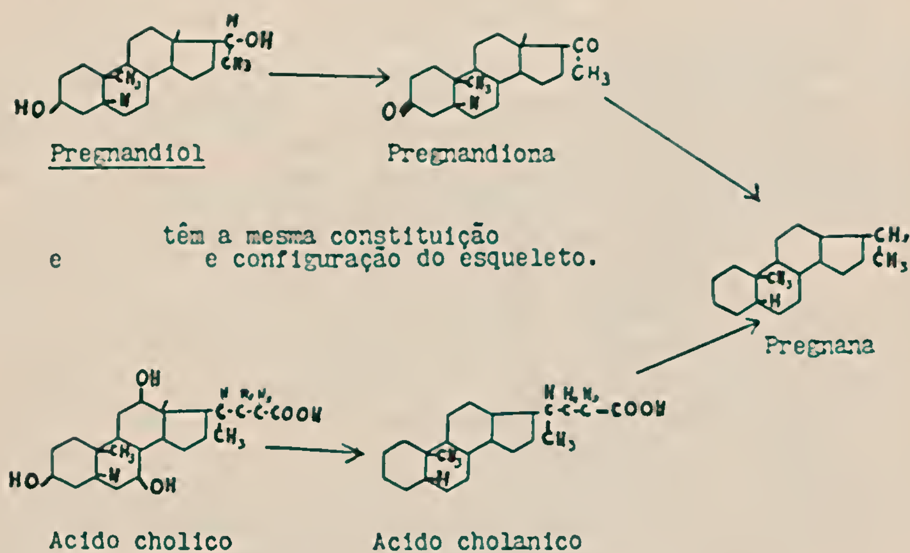


Do *estriol*, que é, physiologicamente, cem vezes menos activo do que a *estrona*, pode-se obter esta ultima, deshydratando-se com bisulfato de potassio (5). Portanto, o estriol possue, em logar do grupo cetonico da estrona, duas hydroxylas vizinhas. Fundindo-a com potassa caustica, a molecula rompe-se neste logar com formação de dois grupos carboxylicos, que, ao se aquecer no vacuo com anhydrido acetico, produz um anhydrido, mas não dá um annel cetonico. Baseado em casos analogos, sabemos que este acido dicarbonico deve ter-se originado de um annel penta, isto é, neste caso tambem o grupo cetonico da estrona devia ter estado num annel penta. Este annel penta está collocado num esqueleto de phenantreno na posição 1, 2, porque o acido dicarbonico mencionado pode ser deshydrogenado com selenio e a hydroxyla phenolica pode ser removida por destillação com zinco em pó, do que resulta 1, 2-dimethylphenantreno (6). O grupo phenolico foi localizado pela seguinte prova: a estrona foi methylada, o grupo cetonico reduzido pelo selenio e o 7-methoxy-1, 2-cyclopenteno-phenantreno obtido era identico á substancia syntheticamente accessivel. Assim ficou provado que o grupo hydroxyla da estrona está no logar indicado e que o annel

escripto á esquerda é o aromatico (7). Ainda resta provar onde ficam o grupo methyla e o grupo cetonico. Com iodeto de methyl-magnesio preparou-se o carbinol, que scinde agua facilmente. A dupla ligação foi hydrogenada e o systema deshydrogenado com selenio, do que resultou o 7-methoxy-3', 3'-dimethyl-1, 2-cyclo-penteno-phenanthreno, tambem syntheticamente accessivel. Portanto o grupo methylico está na posição 13 e o grupo cetonico em 17 (8).

No anno de 1933, dois chimicos industriaes, Schwenk e Hildebrandt, descobriram um facto notavel (9): reduzindo-se o grupo cetonico da estrona com sodio metallico e alcool ao alcool secundario, conseguem-se dois isomeros opticos que são muito mais activos do que a substancia até então considerada como hormonio follicular. A principio, pensou-se naturalmente que desta maneira fosse possivel melhorar a actividade de um producto natural por via synthetica. Já naquella época, porém, os dois descobridores suppunham que talvez uma destas dihydro-estronas fosse o verdadeiro hormonio follicular. Em 1935, finalmente, Doisy (10) insulou de 1500 kilos de ovarios de porco, como uma unica substancia desta classe de corpos, o verdadeiro hormonio follicular, que é identico a uma das duas dihydro-estronas. A essa substancia hoje denominamos de estradiol e é justamente aquelle isomero optico, o que possue a acção physiologica um pouco mais intensa.

Como já relatei, sabemos hoje que o pregnandiol encontrado, em 1929, na urina gravidica representa a forma sob a qual o *hormonio do corpo amarello* é eliminado. Apesar de o pregnandiol não apresentar mais effeito physiologico, lógo se suppusera que estivesse proximamente relacionado aos hormonios sexuaes. Si o alcool diatomico pregnandiol (Fig. 3) for oxydado á dice-



tona pregnandiona e os grupos cetonicos forem reduzidos nessa substancia, obtem-se o hydrocarboneto, a pregnana, que tambem pode ser preparada do acido cholico, passando pelo acido cholanico (4). Agora se conhece perfeitamente o esqueleto do acido cholico e mesmo a estereo-localização dos quatro anneis entre si O facto, de o pregnandiol e o acido cholico fornecerem o mesmo hydrocarboneto, a mesma pregnana, prova, portanto:

1) que ambos os corpos possuem o mesmo esqueleto;

2) que, tanto o pregnandiol, como o acido cholico, têm os anneis A e B na posição cis;

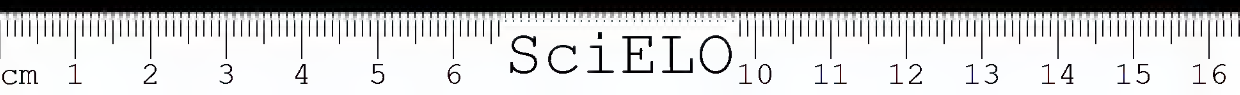
3) que um dos dois grupos hydroxylicos do pregnandiol está no logar onde no acido cholico se encontra a ramificação na cadeia lateral.

Por analogia á cholesterina, era de antemão provavel que o grupo hydroxylico do pregnandiol estivesse no logar indicado; mais tarde, isto ficou provado pela oxydação do mono-acetato do pregnandiol para um acido dicarboxylico caracteristico.

Quando em 1929, comecei a trabalhar em Breslau com o gynecologista E. Fels, com a colaboração do chimico H. Ruschig, na insulação do hormonio do corpo amarello da propria glandula, nada se sabia ainda sobre a relação intima entre o pregnandiol da urina e o hormonio gravidico do corpo amarello. Para dar uma idea da technica da insulação de uma substancia tão sensivel, partindo de grandes quantidades de material, vou descrever o melhor methodo para a purificação do hormonio do corpo amarello, como o obtivemos depois de um intenso trabalho de cinco annos (11).

Partiamos geralmente da quantidade de ovarios extrahidos na matança de 1600 porcos. Conforme sabemos hoje, esta quantidade de ovarios contém mais ou menos 80 mgs. de hormonio puro, do qual naturalmente se pode obter de facto, pela technica a mais aperfeiçoada, sómente 30 mgs.. A materia prima, 20 kgs. de ovarios, fornecem, depois de cuidadosa enucleação das glandulas do corpo amarello, mais ou menos 5 kgs. de corpos amarellos, que, bem moidos, eram extrahidos durante 40 horas num extractor especial com alcool acidulado. Muitissimo importante é, porém, que se evapore a solução de hormonio numa temperatura mais baixa possivel num evaporador de alta potencia, isto é, que permitta evaporar p. ex. 10 litros por hora a uma temperatura que não passe de 25°. Depois da eliminação das phosphatidas obtêm-se 65 gs. de oleo crú, com pouco mais de 200 unidades physiologicas.

Por meio da distribuição deste oleo crú entre methanol e glycerina, de um lado, e benzina, do outro, depois entre alcool de 70% e benzina, pudemos

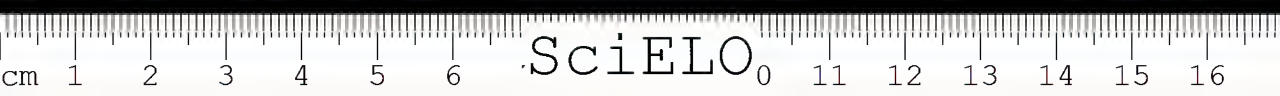


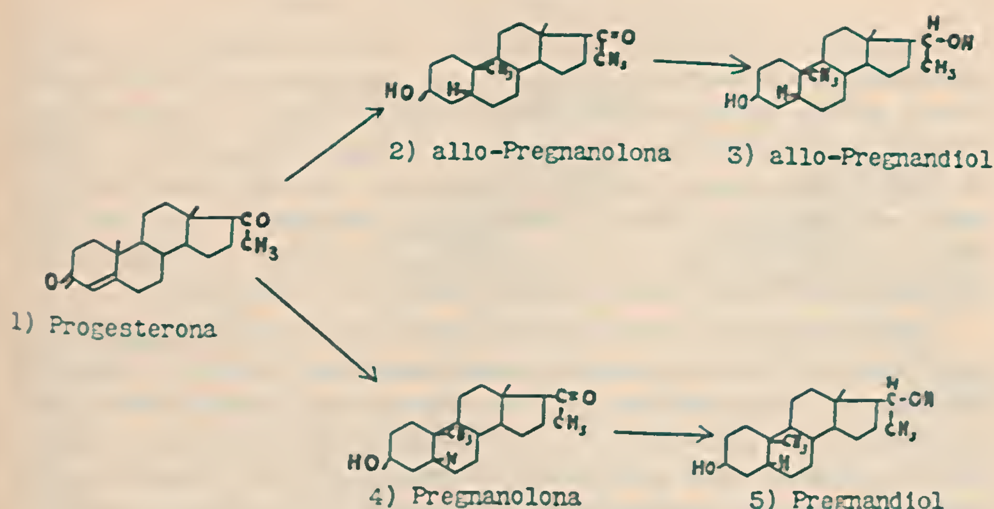
alcançar excellente purificação, obtendo 5 gs. de oleo intermediario com 160 unidades. Neste grau de pureza, é finalmente possivel applicar uma separação chimica: o hormonio de gravidez (e as substancias que o acompanham, das quaes ainda falaremos) produz, com semicarbazida, semicarbazonas. Por desdobramento particularmente cuidadoso desta semicarbazona com o soluto de acido oxalico obtivemos o hormonio gravidico, depois de varias recrystallizações, num rendimento de 30 mgs., que ainda corresponde a 60 unidades. Ainda não estavamos bem certos si as duas formas crystallinas fossem formas isomeras ou polymorphas de progesterona. Pelas experiencias biologicas de meu collaborador Fels verificamos tratar-se de isomeros, enquanto outros as consideram como substancias polymorphas. A decisão definitiva entre estas duas opiniões ainda não poude ser alcançada seja chimica, seja physicamente. As respectivas experiencias biologicas ainda são disputaveis, devido á escassez de material disponivel e ás difficuldades das provas. Mas isto é uma questão de segunda ordem.

Como já disse, ainda retirámos, durante nossa extracção, uma outra substancia do corpo amarello, além do hormonio gravidico ou progesterona propriamente dita, que agora é denominada allo-pregnanolona. Esta é obtida de 20 kgs. de material numa quantidade de 2 mgs.. Como ainda veremos, é muito semelhante á progesterona e alegro-me de, já no anno de 1934, termos podido descrevel-a em nossas primeiras publicações com sua formula e suas propriedades, apesar da pequena quantidade em que foi obtida.

A progesterona possue, segundo a analyse, o mesmo numero de atomos de carbono como o pregnandiol e tambem dois atomos de oxygenio como este, porem 6 atomos de hydrogenio a menos. Admittindo-se que o pregnandiol represente a forma de eliminação do hormonio do corpo amarello, então é cabivel attribuir á progesterona o mesmo esqueleto que ao pregnandiol. Explica-se facilmente a falta de 4 atomos de hydrogenio em relação ao pregnandiol, por ser a progesterona uma dicetona. Como ainda faltam mais dois atomos de hydrogenio, a progesterona tem que encerrar uma ligação dupla. Pudemos verificar esta ligação dupla por hydrogenação e localizal-a pela medição da absorpção de luz, de tal modo que a dupla ligação fica em posição β a um dos grupos cetonicos. A formula, por nós indicada (12) inicialmente, tem sido comprovada em todas as suas partes.

A constituição do producto secundario ha pouco mencionado, que denominei de allo-pregnanolona, tambem poude ser logo elucidada (Fig. 4).

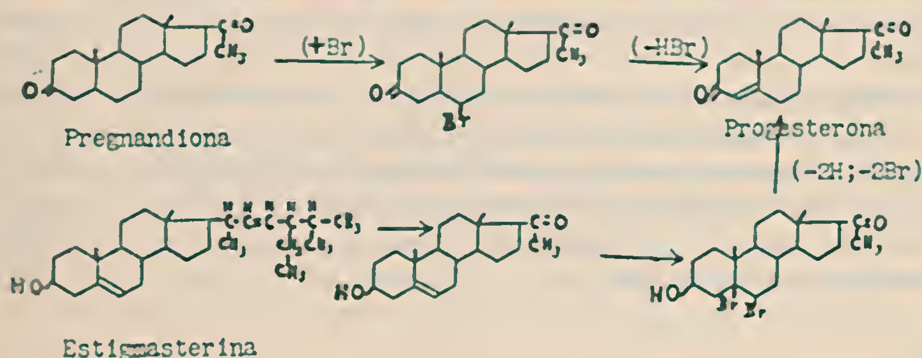




1) e 2) foram isoladas do corpo amarello
3) e 5) da urina gravidica.

Trata-se de um alcool cetonico, que é um producto intermediario de formação ou decomposição da progesterona. Parece-me mais provavel que uma parte da progesterona seja particularmente hydrogenada na glandula, dando a allo-pregnanolona. Apparentemente, o grupo cetonico da progesterona é saturado para um alcool secundario e ao mesmo tempo é saturada a dupla-ligação: naturalmente o atomo de hydrogenio addicionado para a posição 5 pode ligar-se ao grupo methyla em cis ou em trans. Encontrei na glandula somente a substancia trans, que, por hydrogenação subsequente, deveria produzir allo-pregnandiol, que de facto mais tarde foi encontrado na urina por chimicos suissos (13).

Pode-se deduzir da minha descripção, que a obtenção do hormonio do corpo amarello acarreta grandes despesas e muito trabalho, segundo o methodo indicado. Logo depois da insulação, Butenandt (14) e, independentemente, Fernholz (15) conseguiram synthetizar a progesterona. A primeira synthese parte do pregnandiol, que pode ser facilmente transformado em pregnandiona. Por addição de bromo obtem-se a bromodicetona (Fig. 5), da qual, fervida



com pyridina, se scinde acido bromhydrico e forma-se progesterona. Mas o pregnandiol não é facilmente accessivel como materia prima e por esta razão é mais practico partir-se de um esterol do feijão Soja, o estigmasterol, por meio de ozona, e obter uma oxycetona, a cuja ligação dupla se faz a addição de bromo. Esta dibromo-oxycetona transforma-se em progesterona pela oxydação com trioxydo de chromo e desbromação subsequente. Essas duas syntheses ainda não são ideaes e dahi se explica o actual preço exorbitante para o hormonio progesterona, frequentemente insubstituivel na therapeutica.

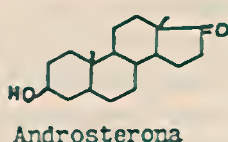
Quando appareceu em 4 de julho de 1934 o meu trabalho em collaboração com Ruschig e Fels (11) sobre as formas crystallinas, analyses e curvas de absorpção etc. da progesterona, ainda não sabiamos que tinhamos tratado nelle, pela primeira vez, da insulação de um hormonio sexual. Com effeito, considerava-se naquelle tempo os productos de decomposição dos hormonios encontrados na urina como sendo os proprios hormonios do testiculo e do folliculo: somente em 1935 foram insulados os verdadeiros hormonios das glandulas femininas e masculinas.

Quanto aos hormonios sexuaes masculinos, conseguiram-se obter em 1930, em Milão (16), substancias elaboradas do testiculo, que em 500 gs. continham 1 unidade-capão. Como podemos avaliar hoje, estes preparados deviam conter cerca de 4% de hormonio puro. Como se deu com o hormonio feminino, tambem a difficil extracção da glandula do testiculo foi interrompida durante annos, quando se verificou que na urina masculina apparecem substancias que agem sobre os caracteres sexuaes secundarios de castrados, como o proprio hormonio da glandula.

A Schering-Kahlbaum A. G., que tinha organizado nos annos anteriores de um modo amplo a colheita e extracção de enormes quantidades de urina gravidica, possibilitando o trabalho de elucidação constitucional da estrona, colheu então enormes quantidades de urina nos postos da Policia Berlinense (17). Esta urina foi acidulada e extrahida por solventes organicos e o extracto, libertado de materias acidas. Obteve-se um oleo crú que foi purificado, por distribuição entre dois liquidos immisciveis, por Butenandt e seus collaboradores, a tal ponto, que a substancia activa poude ser eliminada como oxima. Depois do desdobramento da oxima, a cetona foi sublimada no alto vacuo e recrystallizada de alcool diluido. Assim, em 1931, foi possivel obter de cerca de 2500 litros de urina masculina 11 mgs. de uma oxycetona saturada, que foi denominada androsterona.

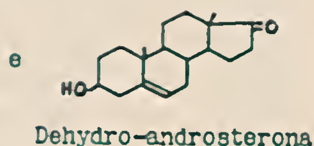
Como a formula da androsterona é $C_{19}H_{30}O_2$, ella contem 8 atomos de hydrogenio a menos do que uma parafina saturada com 19 atomos de carbono e, portanto, deve ser constituida de quatro anneis, tal como a estrona e a progesterona. Por analogia á estrona Butenandt, desde o principio, adoptou a formula representada na Fig. 6 (18).

A urina masculina contem



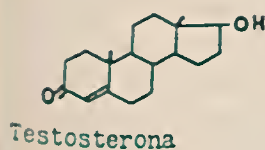
Androsterona

e

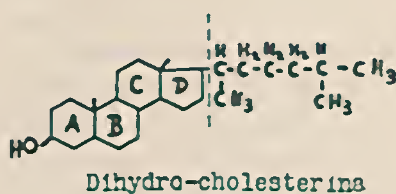


Dehydro-androsterona

mas o testiculo



Testosterona



Dihydro-cholesterina

No anno de 1934, Butenandt encontrou ainda uma dehydro-androsterona, que apparece na urina na mesma quantidade que a androsterona. (19).

A investigação das substancias da urina masculina foi, porém, difficultada por dois motivos: em 1931, foram obtidas 15 mgs. de androsterona, e, até o principio de 1934, a quantidade total só poude ser augmentada de mais 10 mgs.. Naturalmente, estas quantidades não eram sufficientes para estudos biologicos ou chimicos. Além disso, a androsterona actuava sobre *um* dos caracteres sexuaes secundarios de animaes castrados, mas não igualmente sobre todos; na prova do gallo-capão, ella dava bons resultados; na prova da vesicula espermatica, na qual a hypertrophia da genitalia accessoria infantil de roedores é usada como medida, essa substancia produzia apenas effeitos muito moderados. Achava-se até duvidoso que a androsterona representasse o verdadeiro hormonio sexual masculino.

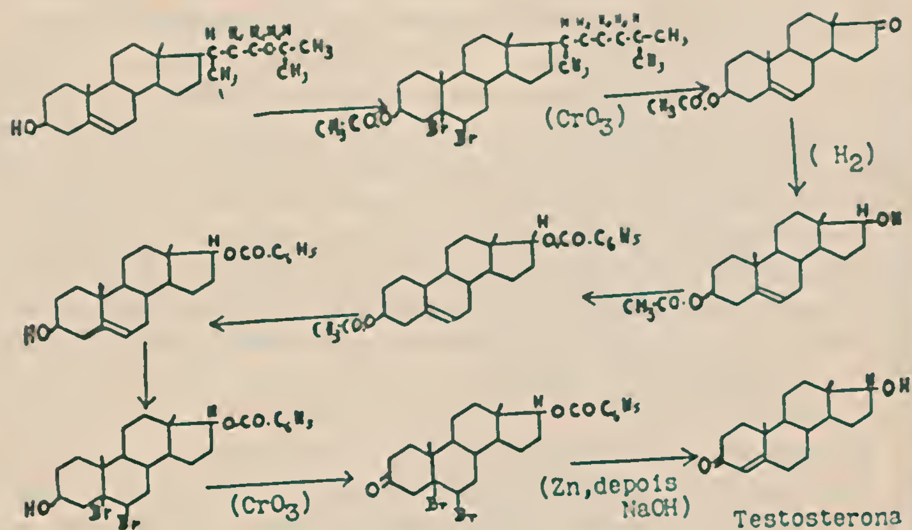
Ambas as difficuldades foram removidas no anno 1934. De um modo genial, Ruzicka obteve as substancias masculinizantes por via synthetica; quasi ao mesmo tempo, após muito trabalho, foi insulado da propria glandula, isto é, do testiculo do touro, o verdadeiro hormonio masculino por Laqueur e seus collaboradores.

Quanto á synthese da androsterona e de productos semelhantes por Ruzicka (20), naturalmente logo dá na vista, na formula supposta por Bute-

nandt, que a substancia representa simplesmente o systema de anneis dos esteroes, sem qualquer cadeia lateral. Por isso, Ruzicka oxidou a dihydro-cholesterina e seus isomeros e epimeros com acido chromico, e obteve realmente, mesmo que em pequeno rendimento, a acetona desejada. Desta maneira, elle até poude penetrar algo sobre a estereo-localização do grupo hydroxyla e sobre a dos anneis A e B, pois, somente da forma chamada epiforma da dihydro-cholesterina conseguiu-se a propria androsterona. Até ficamos sabendo que o grupo hydroxyla, e o atomo de hydrogenio se encontram em cis, os anneis A e B, porém, em posição trans um para o outro.

Quando Laqueur (21) e collaboradores insularam do testiculo o verdadeiro hormonio masculino, ficou provado que esta substancia era a mais activa de todas as semelhantes quanto á sua acção physiologica e Laqueur a denominou de *testosterona*. E' uma oxycetona não saturada, que contém uma ligação dupla na posição α, β em relação ao grupo cetonico, como prova a absorpção de luz. Portanto, era muito provavel que tivesse a mesma estructura que a nossa *progesterona*, possuindo, porém, em vez da cadeia lateral do hormonio gravidico, um grupo alcoolico secundario. Baseado em todas as experiencias de Ruzicka, logo foi possivel synthetisar-se (22) esta substancia e conseguir-se assim a demonstração mais brilhante de sua constituição.

Neste caso, partiu-se da cholesterina (Fig. 7).



Esta substancia deixa-se transformar facilmente em acetato dibromado com bromo e acido acetico anhydrico. Pela oxidação, já mencionada, com acido chromico e eliminação do bromo foi conseguido o acetato de trans-dihydro

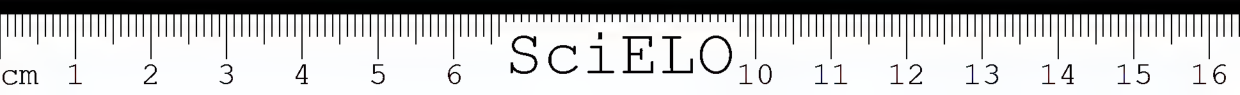
androsterona. Si este fôr hydrogenado em alcool com catalysador de nickel, pode-se conseguir que só o grupo cetonico seja saturado para hydroxyla, mas não a dupla ligação. Si o novo grupo hydroxyla for benzoylado, consegue-se um derivado diacyla, no qual o radical acetyla possue menor affinidade do que o radical benzoyla. Por meio de saponificação cuidadosa, obteve-se a substancia com um grupo de hydroxyla livre do annel A, que, depois da addição de bromo no dupla ligação, é oxydada com acido chromico a um derivado cetonico. Pela eliminação do bromo e saponificação do radical benzoyla, consegue-se a *testosterona*, na qual é deslocada por esta reacção a dupla ligação do annel B para o annel A.

Mas, apesar de todos estes resultados, restou ainda o facto incomprehensivel, de uma certa materia X no testiculo, a augmentar o effeito da testosterona. Mas tambem esta foi encontrada: apparentemente é o acido palmitico que auxilia o hormonio a ser mais bem reabsorvido pelos tecidos. Pode-se alcançar tambem um effeito mais intenso da testosterona, si esta fôr esterificada; realmente, o ester propionico mostrou-se como o mais efficaz (23). Aliás, o effeito do estradiol tambem é augmentado, si for usado como ester, e, de facto, quasi sempre o estradiol é empregado como benzoato.

Tanto o hormonio do folliculo, como o do testiculo, não sendo esterificados, são decompostos rapidamente demais, e, com certeza, os hormonios se encontram nas glandulas, não em estado livre, mas sim em forma de esteres facilmente saponificaveis.

Tanto os hormonios como as vitaminas estão hoje em grande moda na sciencia, technica, literatura e medicina. Na medicina estes productos offerecem grandes perigos, pois, acreditando-se no que dizem certos folhetos de propaganda bem feitos, em qualquer estado morbido deve-se injectar frequentemente e antes de qualquer outra medicação, um preparado de vitamina ou de hormonio. Mas a questão da applicação clinica dos hormonios é de solução muito mais complicada do que suppõem os medicos em geral. O organismo depende de um equilibrio hormonal bem acertado. As glandulas sexuaes produzem seus hormonios somente, por assim dizer, sob ordem superior; neste caso a hypophyse é a autoridade preposta á funcção de commando. Os hormonios, até agora chimicamente desconhecidos, do lobo anterior da hypophyse são os que estimulam no testiculo e nos ovarios a producção da testosterona, do estradiol e da progesterona. Além disso, as glandulas sexuaes actuam novamente sobre a hypophyse, conforme está descripto com minucia no excellente e moderno livro de Thales Martins (24).

Ainda existe um numero infinito de problemas sobre hormonios sexuaes a resolver, especialmente neste país cheio de futuro para um chimico. Natural-



mente, como em todo o mundo, tambem aqui já se fabricam preparados, que contêm (ou deviam conter) hormonios sexuaes. Estes, porém, na maior parte consistem de glandulas seccas ou extractos de urina, e talvez, com frequencia, de um pouco de yohimbina. Além disso, já se encontram no mercado, importados, o benzoato de estradiol, a progesterona e o propionato de testosterona.

Quando, ha cerca de dois annos, me foi commettida a tarefa tão difficil quão interessante, de installar no Instituto Butantan uma secção moderna de chimica, já tinha, desde o principio, o intuito de continuar meus trabalhos sobre hormonios sexuaes. Naturalmente, no inicio encontrámos difficuldades em criar as installações adequadas. Estes trabalhos, porém, já progrediram de tal maneira, que nos foi possivel reatar em diversos pontos o trabalho sobre hormonios sexuaes. Os trabalhos de Ruzicka incitaram-nos a executar tambem aqui a synthese de testosterona. A intima collaboração com a secção de Physiologia do Instituto permittiu tomarmos tambem em consideração a possibilidade de trabalharmos com o folliculo e o corpo amarello de cobras. Finalmente, começámos a preparação industrial de estrona partindo da urina de eguas prenhes, assumpto sobre o qual pretendemos, em collaboração com os drs. Szyszka e Blanke, tratar em proximo trabalho.

RESUMO

Uma comparação dos hormonios até agora estudados apenas sob o ponto de vista physiologico e os já chimicamente preparados, mostra que estes em proporção áquelles são em numero ainda bastante reduzido. O facto de que justamente os hormonios sexuaes tenham sido descobertos em tempo relativamente curto justifica-se perfeitamente. Existe uma differença nitida entre os verdadeiros hormonios sexuaes, formados nas respectivas glandulas, e seus productos de desdobramento, que se apresentam na urina; o descobrimento da estrona, do pregnandiol e da androsterona precedeu ao do estradiol, da progesterona e da testosterona, i. é., ao dos verdadeiros hormonios.

Um conjuncto das diversas reacções empregadas para o esclarecimento dos hormonios, feito em confronto com os varios processos syntheticos para sua obtenção, é agora apresentado para cada um dos casos estudados.

Assignalaram-se tambem os novos trabalhos da Secção de Chimica do Instituto Butantan nesse terreno, taes como: ensaios sobre a synthese da testosterona, extracção de hormonios do folliculo e corpo amarello de serpentes e preparação industrial de estrona extrahida da urina de eguas prenhes.

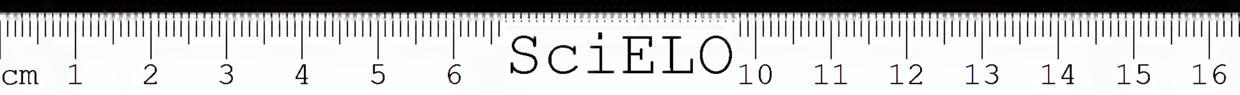


ZUSAMMENFASSUNG.

Eine Zusammenstellung der bisher nur physiologisch festgestellten und der schon chemisch dargestellten Hormone ergibt, dass die Zahl der letzteren in Verhaeltnis zu den ersteren noch sehr klein ist. Dass gerade die Sexualhormone verhaeltnismaessig schnell entdeckt werden konnten, wird begruendet. Es wird scharf zwischen den wirklichen Sexualhormonen, wie sie in der Druese gebildet werden, und ihren Abbauprodukten, wie sie im Harn erscheinen, unterschieden. Die Entdeckung des Oestrons, Pregnandiols und Androsterons ging der Auffindung von Oestradiol, Progesteron und Testosteron, also der der wahren Hormone, voran. Eine Zusammenstellung der Reaktionen zur Aufklaerung der Hormone, wie auch eine Zusammenstellung der synthetischen Wege zu ihrer Gewinnung, wird in jedem Falle gegeben. Die neuen Arbeiten der chemischen Abteilung auf diesem Gebiete werden angedeutet: Versuche zur Synthese des Testosterons, Extraktion von Hormonen aus Follikel und Gelbkoerper der Schlangen und technische Herstellung des Oestrons aus dem Harn von schwangeren Stuten.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Doisy, E. A.* — Amer.J.Physyol. 90:329.1929.
   Deisy, E. A.; Veler, C. D. & Thayer, S. — J. Biol. Chemistry 85:499.1930.
2. *Butenandt, A.* — Naturwissenschaften 17:879.1929.
3. *Marrian, G. F.* — Biochem.Journ. 23:1090.1929.
4. *Butenandt, A.* — Ber.dtsch.chem.Ges. 63:659.1930 *et* 64:2529.1931.
5. *Butenandt, A. & Hildebrandt, F.* — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie 199:256.1931.
6. *Butenandt, A.; Weidlich, H. A. & Thompson, H.* — Ber.dtsch.chem.Ges. 66:601.1932.
7. *Cohen, A.; Cook, J. W.; Hewett, C. L. & Girard, A.* — Journ.Chem.Soc. 653.1934.
8. *Cohen, A.; Cook, J. W. & Hewett, C. L.* — Journ. chem. Soc.: 445.1935.
9. *Schwenk, E. & Hildebrandt, F.* — Naturwissenschaften 21:177.1933.
10. *Doisy, E. A.; Mac Corquodale, D. W. & Thayer, S. A.* — Weekly Bull. St. Louis Med.Soc. 29:28.1935.
11. *Slotta, K. H.; Ruschig, H. & Fels, E.* — Ber.dtsch.Ges. 67:1270.1934.
12. *Fels, E.; Slotta, K. H. & Ruschig, H.* — Klin.Wschr. 13:1207.1934
   Slotta, K. H., Ruschig, H. et Blanke, E. — Ber.dtsch.Chem.Ges. 67:1947.1934.
13. *Hartmann, M. & Locker, F.* — Naturwissenschaften 22:856.1934.
14. *Butenandt, A. & Schmidt, J.* — Ber dtsch.chem.Ges. 67:1901.1934.
15. *Fernholz, E.* — Ber.dtsch.chem.Ges. 67:1825, 2027.1934.
16. *Frattini, B. & Maino, M. M.* — Arch.Ist.biochim.ital. Nos. 1, 4. Suppl. 1930.



17. *Butenandt, A.* — Ztschr. angewandte Chem. 44:905.1931.
18. *Butenandt, A. & Tscherning, K.* — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 229:185.1934.
19. *Butenandt, A. & Dannenbaum, H.* — Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 229:192.1934.
20. *Ruzicka, L.; Goldberg, M. W.; Meyer, J.; Bruengger, H. & Eichenberger, E.* — Helv.chim.Acta. 17:1395.1934.
21. *David, K.; Dingemanse, E.; Freud, J. & Laqueur, E.* — Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 233:281.1935.
22. *Ruzicka, L. & Wettstein, A.* — Helv.chim.Acta 18:1264.1935.
23. *Ruzicka, L. & Wettstein, A.* — Helv.chim.Acta 19:1141.1936.
24. *Martins, Thales* — Glandulas Sexuaes e Hypophyse anterior, Editora Nacional, 1936.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).



612.4

SOBRE A CHIMICA DOS HORMONIOS SEXUAES

2. Obtenção da estrona da urina de eguas prenhes

POR

C. H. SLOTTA; G. SZYSZKA & E. BLANKE.

Embora no decurso do ultimo decennio tenham sido publicados innumeros trabalhos sobre a estrona e o estradiol, os respectivos auctores raramente indicam com minucia o processo da preparação dessas substancias.

Já em 1927, um de nós (1) se dedicou á extracção do hormonio sexual feminino do succo do folliculo e mais tarde da urina de mulheres gravidas. Mais ou menos na mesma epoca, outros auctores (2) empregaram a urina como material de partida para a extracção de substancias estrogenicas. Tambem a industria, especialmente a firma Schering-Kahlbaum A. G., depois de ensaios pouco felizes com o emprego da placenta e do succo follicular como material de partida, desde o anno 1928, começou a extrahil-o, em grandes quantidades, da urina de mulheres gravidas. Graças a isso vieram os conhecimentos que mais tarde serviram para orientação na preparação industrial de grandes quantidades de estrona extrahida da urina de eguas gravidas. Quando, em 1930, Zondek (3) descobriu que a urina de eguas prenhes expelle de 20 a 100 vezes mais estrona do que a urina de mulheres gravidas, poude-se dar inicio á preparação do producto em maior escala, extrahindo-se da urina de eguas bem mais accessivel.

Segundo Zondek (3), é completamente impossivel extrahir a estrona da urina, em geral ligeiramente alcalina, de eguas prenhes, mediante emprego de solventes organicos, como sejam ether e benzol. Zondek, porém, mostrou que a estrona pode ser extrahida da urina de eguas, fervendo-se esta, depois de acidulada, e extrahindo-se em seguida com benzol. De suas experiencias se conclue que a estrona está na urina de eguas em uma combinação facilmente hydroly-

savel, enquanto que na urina de mulher ella se acha em estado livre. Baseando-se nesses dados, todas as fabricas e mesmo pesquisadores autonomos passaram a acidular mais ou menos fortemente a urina de eguas antes de sua extracção, deixando-a, ou repousar 8-14 dias á temperatura ambiente, antes de extrahil-a, ou fervendo-a após a acidulação.

Sendo a estrona um tanto insoluvel em ether, emprega-se na technica para a extracção, com preferencia, o benzol, o toluol ou o chloroformio. A respeito da preparação, na firma Schering-Kahlbaum A. G., do oleo crú da urina de mulheres gravidas, o qual serviu especialmente como materia prima ás pesquisas de A. Butenandt, sabe-se apenas que "foram elaborados methodos, para a obtenção em grande escala de um oleo com o grau de pureza 30 — 40.000 U. C. por g.". (4).

Todas as publicações sobre a extracção da estrona da urina de eguas confessam que a hydrolyse acida é inevitavel; assim tambem Beall e collaboradores (5 e 6) acidulam a urina concentrada até 1/4 de seu volume num pH de 1,0, antes de extrahil-a com toluol. Girard (7), embora não indique exactamente com o que elle extrahe, procede de modo semelhante.

Além dos methodos de extracção, nos ultimos annos por todas as partes elaboraram-se technicas pelas quaes se remove a estrona do soluto, mediante algum meio de adsorpção. Doisy (8) foi quem mais se valeu desse processo. Enquanto que elle antigamente extrahia a urina com alcool butylico, ultimamente passou a acidulal-a até que a solução attinja uma concentração em acido chlorhydrico igual a N/1. Nesse processo a estrona se separa muito finamente depois de uma semana, e é adsorvida por addição de um soluto concentrado de benzoato de sodio ao acido benzoico precipitado. Tratando-se, então, o acido benzoico com ether, obtém-se do ether, tanto a estrona, como o acido benzoico.

Executamos varias vezes esse processo sem resultado satisfactorio: todos os methodos que exigem uma filtração de grandes quantidades de urina, são extremamente desagradaveis, em vista do horrivel cheiro das consideraveis quantidades de liquido. Mesmo para as industrias, que teriam que trabalhar com filtros fechados especializados, não achamos aconselhavel esse processo.

Por mera gentileza do dr. Venancio Deulofeu, ficamos conhecendo um processo de adsorpção adoptado na Argentina, no qual a urina, levada ao pH = 1, repousa de 10 a 20 dias. Produz-se, então, pela addição de sangue e aquecimento do soluto, um coagulo proteinico, o qual adsorve a estrona. Depois da filtração, pode a estrona ser separada do adsorvente mediante emprego de alcool. Ainda não colhemos experiencias proprias com este methodo, visto que, pelos motivos já expostos, nos repugnava a filtração da urina nos compartimentos de que dispomos.

Enquanto que todos estes processos conduzem á adsorpção em um meio bastante acido, ficou-se ultimamente conhecendo um processo de adsorpção, no

qual se faz passar uma corrente de di-oxydo de carbono pela urina, tendo silicato de sodio em solução. O acido silicico assim precipitado deve adsorver (9) toda a estrona em um soluto de acido carbonico. Isto seria tanto mais interessante, quanto este resultado estaria em completo desaccordo com os dados fornecidos por Zondek. Dado que estas indicações sejam exactas, não resta duvida de que a estrona, contida na urina, esteja em qualquer combinação com outras substancias, devendo esta combinação ser bem instavel.

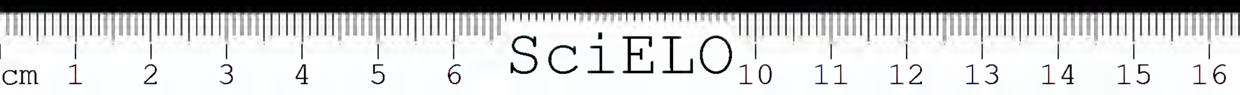
Technica usada

Depois das experiencias pouco animadoras feitas com o processo de adsorpção de Doisy (8), passamos primeiramente a acidular a urina de nossas eguas até o pH = 1, deixando-a repousar 10 dias e extrahindo-a depois com benzol em um extractor de vidro com agitador e chapa-filtro de vidro poroso, durante 24 horas. Desistimos, desde o principio, do emprego de chloroformio para a extracção, visto os apparelhos de extracção para solventes mais pesados do que agua serem mais difficeis de construir e sua capacidade mais reduzida. Além disso, o chloroformio é um solvente bem mais caro do que o benzol.

Partimos sempre da urina de eguas, que se achavam do 4.° ao 9.° mês de gestação. Segundo opinião unanime de pesquisadores, só nestes meses é o teor em estrona tão apreciavel, que compense a fabricação. Beall e Edson, p. ex., fornecem os seguintes dados a respeito (6): 100 litros de urina contêm uma media de 7,5 gs. de substancias estrogenicas, o que poude ser provado colorimetricamente. Segundo outros dados dos mesmos auctores, isto corresponde a um teor medio de 2,5 gs. de estrona em 100 litros de urina de eguas do 4.° ao 9.° mês de prenhez.

Os auctores citados tratam o extracto de urina de tal modo, que se evapore o solvente (neste caso toluol) e extrahem o residuo com um soluto de hydroxydo de sodio. Pelo mesmo processo obtivemos tão grande quantidade de residuo, que nos vimos forçados a abandonar esse processo. Pelo repouso muito prolongado da urina em soluto acido, desdobra-se o acido hippurico contido em grande quantidade na urina equina, e o acido benzoico, facilmente soluvel em solventes organicos, é extrahido na extracção subsequente, conjunctamente com a estrona e a indirubina ou corante da urina.

Dahi nasceu a idea de procedermos a experiencias afim de verificarmos si a mesma quantidade de estrona não poderia ser obtida de urina menos acidulada. Ficou provado que era este o caso e que podiamos obter a mesma quantidade de estrona até de uma urina fresca nada acidulada, a qual tem um pH de 8 a 9. Isto simplificou extraordinariamente a elaboração do oleo crú e conseguimos



extrahir, completamente e de uma só vez, quantidades apreciaveis de urina fresca num extractor de metal. Nossas experiencias estão de certo modo em contradicção com as indicações fornecidas por Zondek: no entanto, se acham de pleno accordo com os dados da patente acima citada.

De conformidade com as indicações fornecidas pela Secção de Physiopathologia deste Instituto, (Dr. Thales Martins), a urina posta á nossa disposição continha em cada litro apenas 75.000 unidades camondongos (U.C.). Assim sendo, o teor em estrona poderia, segundo provas biologicas, montar approximadamente a 750 mgs. por cada 100 litros de urina. O facto de que outros pesquisadores (3, 6, 8), inclusive o dr. Deulofeu, tenham encontrado valores mais elevados, pode ser attribuido a que no nosso caso a urina por qualquer lapso tenha estado misturada com urinas de eguas com menos meses de prenhez. Sòmente outras pesquisas poderão solucionar a questão de se saber si o alimento dado aos animaes no Brasil ou por acaso as diversas raças têm alguma influencia, nesse sentido.

De 100 litros de urina á nossa disposição, conseguimos sempre extrahir cerca de 80 gs. de um oleo crú castanho-escuro, cuja elaboração mais ampla experimentamos a principio pela adsorpção chromatographica (10). Nenhum resultado satisfactorio obtivemos com o oxydo de aluminio nem com o oxydo de calcio. Dahi termos empregado de preferencia, para a purificação subsequente, o optimo methodo de Girard (7).

Enquanto que geralmente se trata de separar corpos cetonicos mediante o emprego exclusivo de hydroxylamina, semicarbazida ou reagentes semelhantes, por serem compostos difficilmente soluveis em agua, Girard prefere preparar um derivado cetonico facilmente soluvel em agua. As substancias sem caracter cetonico podem ser removidas desse soluto com ether, e então, o derivado cetonico retido na agua pode ser desdobrado e só agora o proprio corpo cetonico, extrahido com ether. De todos os reagentes aconselhados por Girard para esse fim, escolhemos o "reagente T", isto é, o chloreto de betaina-hydrazida $Cl\ (CH_3)_3\ N.CH_2.CO.NH.NH_2$, o qual nós mesmos preparámos com ester ethylico do acido chloro-acetico, trimethylamina e hydrazina.

Segundo prescripção de Girard, obtêm-se de 80 gs. de oleo crú mais ou menos 5 gs. de uma fracção cetonica, bastante impura. Com hormonio purificado pudemos verificar que realmente toda a estrona é separada pelo "reagente T" no sentido desejado, uma vez observadas estrictamente as condições de formação e decomposição (Vide experiencia 1).

O oleo obtido com a transformação pelo "reagente T", crystalliza apenas parcialmente. Delle insulamos a estrona de tres differentes modos, não tomando em consideração a completa remoção da equilina, equilenina, etc., sinão visando apenas a preparação de um producto crystallizado de alto grau de pureza. Dis-

solvendo-se o oleo em um pouco de ether e deixando-se crystallizar lentamente a -10°, obtem-se a estrona, depois de meticulosa lavagem com ether, em forma de crystaes incolores. Este methodo é um pouco vagaroso, pois se tem que recrystallizar os crystaes varias vezes de methanol, e elaborar as aguas mães (Vide experiencia 2b).

E' preferivel sublimar a estrona no alto vacuo a 220-230°; para esse fim, empregamos um apparelho especial de juntas esmerilhadas. Não resta duvida que este methodo exige um certo apparelhamento, o que o complica um pouco (Vide experiencia 5).

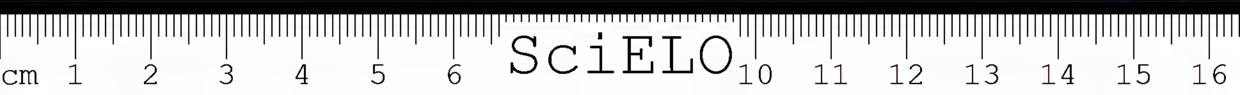
O mais simples é, todavia, dissolver o oleo em alcool methylico e preparar a semicarbazona da estrona, mediante emprego de acetato de semicarbazida (11). Este oleo pode ser recrystallizado de alcool ou purificado por extracção com alcool. O composto incolor pode, pelo repouso, ser facilmente desdobrado de sua solução em alcool methylico com acido chlorhydrico aquoso concentrado (Vide experiencias 1 e 2). Segundo nossas verificações, obtem-se tanto com a sublimação no alto vacuo como pela purificação, passando pela semicarbazona, quando muito, a quarta parte da fracção cetonica conseguida por Girard em forma de estrona crystallizada.

As marchas completas de elaboração por todos estes methodos foram já mais ou menos minuciosamente descriptos na literatura. Por motivos justificaveis ainda não foram publicados nesta sequencia com tanta minucia. Na parte experimental expomos primeiramente algumas experiencias caracteristicas que elucidam o que acabamos de dizer. Pequenas modificações das prescripções originaes, como seja o emprego de chloroformio em vez de ether, ás quaes segundo nossas experiencias damos preferencia, são apontadas na parte correspondente. Justamente taes pontos, á primeira vista insignificantes, são na realidade de especial importancia na elaboração de um processo efficiente para a obtenção de grandes quantidades de material. Na parte final, descrevemos o processo de elaboração, baseado em todas as nossas experiencias e conforme o praticamos hoje em dia (Vide experiencia 6).

Parte experimental

1.ª Experiencia: obtenção quantitativa da estrona pelo "reagente T".

46,6 mgs. de estrona purificada por sublimação, de p. f. 247-248°, foram dissolvidos em 13 cc. de acido acetico alcoolico a 9%, addicionando-se 0,6 gs. de "reagente T" e fervendo-se durante uma hora sob refluxo. A mistura de 11,7 cc. de soda caustica 1,5 N, com 40 cc. de agua e 24 gs. de gelo, foi coberta com 50 cc. de ether num funil de separação. Depois da addição do soluto al-



coolico, agitou-se durante 6 minutos, as camadas foram separadas e o soluto aquoso novamente extrahido com 50 cc. de ether. Desdobrou-se, então, a hydrazona com 7 cc. de acido chlorhydrico concentrado e o hormonio foi dissolvido em chloroformio. Depois de evaporado o solvente e seccado, obtiveram-se 57 mgs. de crystaes, os quaes foram fervidos, durante 2 horas sobre banho-maria, com 5 cc. de um soluto a 10% de acetato de semicarbazida em alcool methylico (Vide experiencia 6c) e filtrados ao vacuo a 0°C. depois da crystallização e então seccados. Seu rendimento foi de 48,7 mgs. de semicarbazona ou seja 86% do theorico. Do soluto mãe ainda se puderam retirar mais ou menos 2 mgs.

2.ª Experiencia: extracção da urina acidulada de eguas.

a) 40 litros de urina de egua foram misturados com acido chlorhydrico concentrado, até que o papel de Congo se tornasse azul; addicionaram-se novamente 4 litros de acido chlorhydrico concentrado, de modo a se obter um soluto de acido chlorhydrico a N/1, e deixou-se repousar quatro semanas (em experiencias semelhantes apenas 1 a 2 semanas, com resultados quasi identicos). Extrahiu-se, então, a urina com benzol, 3 vezes durante 8 horas, concentrando os solutos benzoicos por evaporação. O residuo crystallizado foi dissolvido em 3 litros de um soluto sodico, saturado com acido carbonico e extrahido com benzol duas vezes 8 horas. Pela acidulação com acido chlorhydrico do soluto aquoso extrahido precipitaram-se 540 gs. de acido benzoico impuro.

Após lavagem do extracto de benzol com agua e um soluto saturado de bicarbonato de sodio, e após seccagem com sulfato de sodio, concentrou-se o mesmo, obtendo-se 75 gs. de oleo crú. Este foi tratado com 10 gs. de "reagente T" em 250 cc. de acido acetico alcoolico a 9% e depois, por neutralização do acido com 225 cc. de soluto de soda caustica a 1,5 N em 460 cc. de agua e 200 gs. de gelo e extracção com 2 vezes 200 cc. de ether, separado das substancias neutras que não formam hydrazonas. Depois do desdobramento com 130 cc. de acido chlorhydrico concentrado e extracção completa com ether no extractor, obtiveram-se 2,658 gs. de residuo. Este forneceu 530 mgs. de semicarbazona bruta após transformação com 30 cc. de um soluto de acetato de semicarbazida a 10% em alcool methylico (Vide experiencia 6c.). Pelo desdobramento com um soluto aquoso de acido oxalico (Vide experiencia 4b), obtiveram-se 200 mgs. de estrona.

b) 40 litros de urina foram acidulados até approximadamente um valor igual a acido chlorhydrico 1/10 N (pH=1,2—1,4), dexando-se repousar 4 semanas (em experiencias semelhantes, 1 a 2 semanas, com resultados quasi identicos). A urina foi extrahida com benzol, a principio durante 16 horas e, depois, durante mais 8 horas. O extracto de benzol das primeiras 16 horas foi seccado por evaporação, os 105 gs. de residuo pesado, dissolvidos em benzol e neutralizados com 500 gs. de um soluto saturado de bicarbonato; seguiu-se a sec-

cagem do soluto benzolico com sulfato de sodio. Do soluto aquoso obtiveram-se, pela acidulação e extracção com benzol, 70 gs. de substancias acidas crystallizadas. O residuo do soluto benzoico secco foi de 33 gs., o qual foi transformado em 5 gs. de "reagente T" em 109 cc. de acido acetico alcoolico. Após neutralização, agitação com ether e desdobramento com 55 cc. de acido chlorhydrico concentrado, obtiveram-se 1,23 gs. de corpos cetonicos.

O extracto benzolico das ultimas 8 horas, após lavagem com agua e carbonato de sodio deu 3,4 gs. de residuo, dos quaes, após transformação com "reagente T", obtiveram-se 0,16 gs. de corpos cetonicos. O oleo cetonico castanho, quasi crystallino (num total de 1.39 gs.), foi misturado num tubo de vidro de centrifugador com um pouco de ether e congelado a -10°. Os crystaes foram separados por centrifugação e lavados com ether frio até o residuo se tornar incolor. Obtiveram-se 200 mgs. de estrona de p. f. 248-257°.

c) A mesma experiencia como em 2b forneceu novamente 35 gs. de residuo benzolico e 1.38 gs. de corpos cetonicos. Do ultimo obtiveram-se 324 mgs. de semicarbazona, os quaes, após addição de 3 cc. de acido chlorhydrico concentrado em 10 cc. de alcool absoluto, forneceram 200 mgs. de crystaes do p. f. 248-257°.

d) 60 litros de urina do pH=1,4 após um repouso de 4 semanas foram extrahidos no extractor de cobre descripto na experiencia 6, primeiramente com benzol durante 24 horas, e depois com um novo benzol outras tantas horas. Os extractos de benzol foram concentrados separadamente até o volume de 2 litros, neutralizados com o soluto de soda caustica a 1.6% até a viragem da phenolphthaleina, e evaporados até a seccura. O primeiro extracto deu 52 gs. de oleo crú e 10 gs. o segundo. Esse oleo, depois de combinado com 7.5 gs., (2.5 gs.) de "reagente T" em 200 cc., (16 cc.) de acido chlorhydrico concentrado, deu 2.845 gs. e 0,594 gs. de corpos cetonicos brutos. Depois de combinado com a quantidade correspondente de solutos de acetato de semicarbazida, obtiveram-se 420 e 70 mgs. de semicarbazona.

Uma outra partida de 60 litros de urina, hydrolyzada a um pH=1,4, forneceu 500 mgs. de semicarbazona.

3.ª Experiencia: elaboração de urina não acidulada de egua.

60 litros de urina de egua, depois de 3 dias de repouso e com um pH=8,2—9,0, foram extrahidos durante 48 horas, sendo o benzol concentrado a principio sob pressão atmospherica até 1 litro, e, já que neste caso é prescindivel a lavagem com agua e alcali, evaporado ao vacuo até a seccura. O residuo de extracção com benzol, numa quantidade approximada de 70 gs. após purificação com "reagente T", deu 3,096 gs. de uma fracção cetonica e esta por sua vez 529 mgs. de semicarbazona.

Uma segunda extracção deu 670 mgs. de semicarbazona e em outras extracções de urina, que ficára de 1 a 3 semanas, os resultados foram praticamente identicos.

4.ª Experiencia: desdobramento da semicarbazona com:

a) *acido sulfurico alcoolico.* 400 mgs. de corpos cetonicos foram aquecidos em banho-maria com 20 cc. de acido sulfurico alcoolico 2/N até o ponto de ebullição, o residuo dissolvido em ether e o soluto etherico, lavado com agua. O residuo do ether deu 150 mgs. de crystaes fortemente coloridos, o que corresponde a um rendimento de mais ou menos 45%.

b) *acido oxalico aquoso.* 205 mgs. de semicarbazona foram aquecidos em banho-maria durante 3 horas em um balão com 2.5 gs. de acido oxalico e 3 cc. de agua. Depois de resfriados, triturou-se a massa crystallizada com benzol e ether, misturou-se com agua e separou-se no funil de separação. A camada aquosa foi novamente extrahida com ether-benzol, todo o soluto de benzol-ether lavado com agua e soluto de bicarbonato diluido, seccado com sulfato de sodio e evaporado. O residuo do ether foi de 230 mgs. de crystaes ligeiramente rosados, o que corresponde a um rendimento de 78%.

c) *acido chlorhydrico alcoolico.* 591 mgs. de semicarbazona bruta foram aquecidos rapidamente sobre banho-maria em 25 cc. de alcool absoluto e 6 cc. de acido chlorhydrico concentrado até que tudo estivesse dissolvido. Depois de resfriado, tratou-se com ether, sendo o ether lavado varias vezes com agua, seccado e evaporado. O residuo consistia de 382 mgs. do p. f. 232-254° e o rendimento era de 79%.

De 324 mgs. de semicarbazona em 10 cc. alcool e 3 cc. de acido chlorhydrico concentrado extrahiram-se 200 mgs. de estrona do p. f. 248-257°, o que corresponde a 75% do theorico.

5.ª Experiencia: sublimação no alto vacuo.

A purificação da fracção cetonica obtida com o "reagente T", em vez de passar pela semicarbazona foi executada por sublimação no alto vacuo. Com esse fim, recrystallizaram-se 1.6 gs. da fracção cetonica de 40 cc. de alcool absoluto sob cuidadosa addição de 26 cc. de agua, de modo a resultar alcool a 60%.

Em outras experiencias recrystallizou-se a mesma quantidade de fracção cetonica de 25 cc. de methanol sob addição de agua, gotta por gotta, até turvação; os 0.9 gs. de crystaes pardos obtidos, devidamente seccados na estufa a

105°, foram postos no tubo de sublimação (Vide figura 1). A junta esmerilhada estava devidamente untada com graxa de Ramsay (molle). O apparelho foi então mergulhado em um pequeno banho a oleo e ligadas a agua de refrigeração e a bomba de alto vacuo. A estrona foi sublimada a 220-230° sob uma pressão de 0.02 mm. durante 15 a 20 minutos, depositando-se na parte interna do apparelho refrigerador com agua. Obtiveram-se 0,65 gs. de crystaes ainda ligeiramente pardos. Esses crystaes puderam ser recrystallizados por duas recrystallizações de cada vez 20 cc. de methanol sob introducção cuidadosa de agua (5 a 10 gottas), até que o soluto fervente começasse a turvar-se. Obtiveram-se 0,42 gs. de estrona de p. f. 256°.

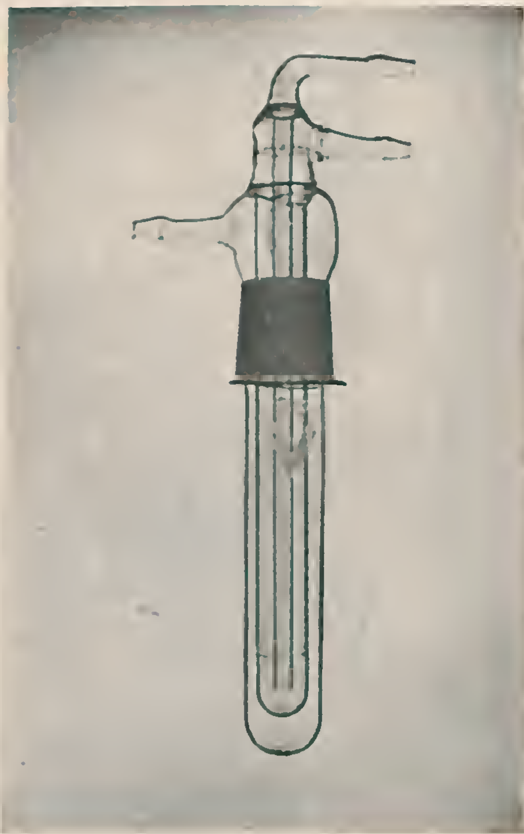


FIG. 1

6.ª Experencia: obtenção de estrona em escala semi-industrial.

a) *Extracção.* O extractor com uma capacidade de 65 a 70 litros (Vide figura 2) é enchido, pelo orificio situado na tampa até a altura da torneira de sahida aberta (B), com 60 litros de urina fresca a um pH=8—9: a torneira de sahida (B) foi fechada: a torneira do ladrão (C), aberta, a urina, coberta com mais ou menos 3 litros de benzol, até que em C escoe o benzol. Fecham-se a torneira do ladrão (C) e o orificio de entrada: colloca-se o recipiente de aquecimento (D) com 2/3 de seu volume (approximadamente 4 a 5 litros) de benzol, liga-se o recipiente ao tubo que communica com o condensador (E): põe-se o agitador (F) em movimento; liga-se a agua de refrigeração a G e o aquecedor para o recipiente (D) e extrahe-se durante 48 horas.

Segundo nossas experiencias, basta extrahir duas vezes durante 24 horas, sendo que, para o segundo dia, só ficam 15% da quantidade total de hormonio.

Depois de resfriado, retira-se a tampa do orificio de entrada (A), deixa-se escoa a urina pela torneira inferior (H) até a camada de benzol, desliga-se o recipien te de aquecimento, e despeja-se o extracto nelle contido dentro de uma garrafa Para a seguinte extracção enche-se novamente com 60 litros de urina, send desnecessario cobril-a co uma nova camada de benzo visto que este permane sempre no extractor. Com pleta-se apenas alguma quan tidade que se haja perdid enche-se novamente o recip ente de aquecimento com a 5 litros de benzol e ex trahe-se novamente durant 48 horas.

O extracto de benzol d 4-5 litros é concentrado p evaporação até 3/4 litros, filtrado em um balão d fundo redondo de 2 litro devidamente lavado com be zol e finalmente concentrad no vacuo em banho-mari Obtem-se assim approxim damente 50 gs. de um ol crú vermelho-escuro.

Fig. 2

b) *Purificação com o "reagente T", segundo Girard.*

Por commodidade, elabora-se de uma só vez o oleo crú de 5 extracçõ 250 gs. de oleo crú são dissolvidos em um balão de 2 litros, em 1,1 litro de aci acetico alcoolico a 9% (preparado com 100 gs. de acido acetico e 1 litro alcool ethylico absoluto). Addicionam-se 45 gs. de "reagente T", lava-se geiramente o gargalo com um pouco de alcool, e ferve-se o soluto durante u

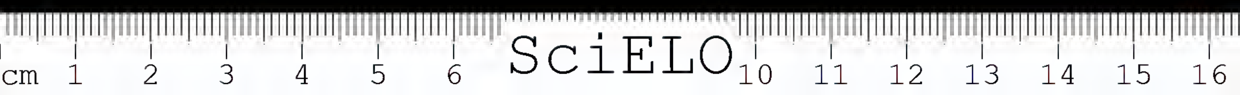
hora sob refluxo. Deitam-se então 3,2 litros de agua, 1,8 kgs. de gelo moido e 990 cc. de soda caustica em um garrafão de 20 litros com torneira no fundo; a soda caustica deve estar preparada de modo que 10 cc. de seu soluto neutralizem 10 cc. do acido acetico alcoolico acima mencionado, o que pode ser comprovado por titulação com phenolphthaleina. O soluto alcalino aquoso é coberto com uma camada de 1,8 litros de ether e o soluto alcoolico, já um tanto esfriado, addicionado de uma só vez. Lava-se então o balão duas vezes com 50 cc. de agua e duas vezes com 50 cc. de ether, e agita-se devidamente o garrafão durante uns 6 minutos. Depois da separação das camadas, solta-se o soluto aquoso pardo de cerca de pH=5, e escôa-se o ether. Após a limpeza do garrafão de gorduras adheridas, agita-se novamente o soluto aquoso com 1,5 litros de ether. Depois da separação da camada aquosa pardacenta do soluto de ether avermelhado, preferivelmente retirando-se a ultima por meio de um siphão, deitam-se 2 litros de chloroformio, accrescentam-se 500 cc. de acido chlorhydrico concentrado e deixa-se repousar durante 1 hora, visando o desdobramento da combinação de Girard, com o que se turva o soluto aquoso pela separação da estrona; ás vezes a estrona se separa em forma de flocos. Depois de uma hora agita-se devidamente, solta-se o extracto de chloroformio e introduz-se uma nova camada de 500 cc. de chloroformio debaixo do soluto. Um quarto de hora mais tarde, agita-se de novo e retira-se o chloroformio. Trata-se a camada aquosa umas 3 a 4 vezes de quinze em quinze minutos com 500 cc. de chloroformio, até que o extracto de chloroformio apenas esteja levemente colorido.

Os extractos de chloroformio reunidos, isto é, approximadamente 4 a 5 litros, são lavados com uma pequena quantidade de soluto de bicarbonato de sodio a 10%, depois, com agua em um grande funil de separação, e em seguida seccados com sulfato de sodio anhydro. Evapora-se primeiramente o soluto de chloroformio sob pressão atmospherica e depois no vacuo em banho-maria e obtêm-se, depois de seccado a 100°, 15 a 20 gs. de residuo.

c) *Purificação pela semicarbazona.*

Segundo T. Reichstein (11) prepara-se um soluto de acetato de semicarbazida: 100 gs. de hydrochloreto de semicarbazida e 150 gs. de acetato de sodio crystallizado são triturados em um crystallizador até se liquefazerem. Lava-se então essa massa com 1 litro de methanol em um balão de Erlenmeyer. Depois de um repouso de 24 horas, filtra-se em um frasco de 1 litro.

Dissolvem-se os 15 a 20 gs. de crystaes brutos em 125 cc. de um soluto de acetato de semicarbazida e mantem-se a mistura durante 4 horas sob refluxo em um banho-maria em ebullição branda. Deixa-se repousar pelo menos 24



horas na geladeira, filtra-se ao vacuo, lava-se com um pouco de methanol frio e secca-se. Obtêm-se 3 a 4 gs. de semicarbazona pouco coloridos, os quaes são extrahidos no Soxhlet com 150 cc. alcool absoluto. A semicarbazona crystalliza do soluto alcoolico quasi que incolor, e quasi nenhuma semicarbazona permanece no soluto mãe depois de um repouso a uma temperatura de O°. E' preferivel recrystallizar a semicarbazona em um soluto aquoso de acetona com a addição de carbono activo.

Os 3 a 4 gs. de semicarbazona pura são ligeiramente aquecidos em banho-maria em 50 cc. de alcool absoluto e 15 cc. de acido chlorhydrico concentrado até se liquefazerem. Depois de esfriados, são absorvidos em ether; o soluto é lavado com agua em um funil de separação; o ether, seccado com sulfato de sodio e evaporado. Obtêm-se 2 gs. de estrona do p. f. 248-257°, os quaes logo podem ser utilizados directamente para a preparação subsequente do benzoato de estradiol.

RESUMO

A extracção industrial da estrona de urina de eguas prenhes é conseguida mais vantajosamente, quando a urina fresca é extrahida com benzol em um extractor adequado. A acidulação previa da urina é desnecessaria e determina, pelo desdobramento do acido hippurico, a formação de grandes quantidades de acido benzoico, que tambem são extrahidas pelo benzol e removidas com difficuldade do soluto benzolico. Para a subsequente purificação o methodo empregado por Girard mostrou-se muito proveitoso. As fracções cetonicas assim obtidas podem continuar a ser purificadas mediante sublimação no alto vacuo ou sobre a semi-carbazona. Em vista do cheiro desagradavel que desprende o material, os methodos que visam separar a estrona da urina por adsorpção, parecem menos adequados de que os que se valem da extracção com solventes organicos, e descriptos neste trabalho.

Tanto por meio do ensaio physiologico, como pela separação chimica da estrona da urina, foi verificado que apenas 750 mgs. de estrona estavam presentes em 100 litros de urina, não tendo sido comprovadas, mesmo com o emprego de urina de eguas do 5.° ao 9.° mês de prenhez, as verificações de maiores quantidades daquella substancia, registadas por outros pesquisadores.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die technische Gewinnung von Oestron aus dem Harn schwangerer Stuten gelingt am besten, wenn der frische Harn in einem Spezialextraktor mit Benzol

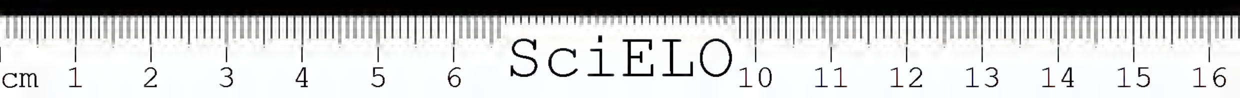
extrahiert wird. Den Harn vorher anzusaeuern, ist unnoetig und bedingt, dass durch Zerfall der Hippursaeure grosse Mengen von Benzoesaeure entstehen, die auch von Benzol aufgenommen werden und daraus schwer wieder zu entfernen sind. Fuer die weitere Aufarbeitung erwies sich der Weg von Girard als ausserordentlich brauchbar. Die so erhaltenen Ketonfraktionen koennen durch Hochvakuum-sublimation oder ueber die Semicarbazone weiter gereinigt werden. Wegen der Geruchsbelaestigung erscheinen die Verfahren, die das Oestron dem Harn durch Adsorption entziehen, weniger geeignet als die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, wie sie hier genau beschrieben wird.

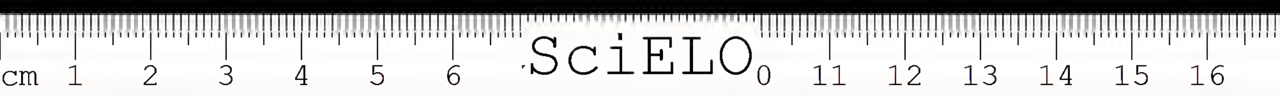
Sowohl durch physiologische Prüfung wie durch chemische Isolierung der im zur Verfügung stehenden Harn enthaltenen Hormon-Mengen ergab sich, dass in 100 Litern Harn nur 750 mg. Oestron enthalten waren. Die viel grösseren Mengen, die andere Forscher teilweise fanden, wurden auch dann nicht erreicht, als nur der Harn von Stuten im 5. bis 9. Trächtigkeitsmonat verwandt wurde.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Slotta, K. H.* — Deutsche Med.Wschr. **51**:2158.1927.
2. *Aschheim, S. & Zondek, B.* — Klin.Wschr. **6**:1322.1927 et **7**:8-9.1928.
3. *Zondek, B.* — Klin.Wschr. (49):2285.1930.
4. *Butenandt, A* — Abhandlung Ges.Wissensch.,Goettingen,Math.-physik.-Klasse, III. Folge (2):31.1931.
5. *Beall, D. & Marrian, G. T.* — J.Soc.Chem.Ind. **53**:309.1934.
6. *Beall, D. & Edson, M.* — Biochem.J. **30**:577.1936.
7. *Girard, A. & Sandulesco, G.* — Helv.Chim.Acta **19**:1095.1936.
8. *Curtis, J. M.; MacCorquodale, D. W.; Thayer, S. A. & Doisy, E. A.* — J.Biol. Chem. **107**:192.1934.
9. *Euchenia, N. V.*, Holland — F.P.811 180 (16.3.36). Chem.Zbl. **2**:433.1937.
10. *Duschinsky, R. & Lederer, E.* — Bull.Soc.Chim.Biol. **17**:1534.1935.
11. *Reichstein, T.* — Helv.Chim.Acta, **19**:45.1936.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 0 11 12 13 14 15 16

612.405

SOBRE A CHIMICA DOS HORMONIOS SEXUAES

3. Constituição das substancias estrogenicas obtidas com o anol

POR

C. H. SLOTTA & W. FORSTER

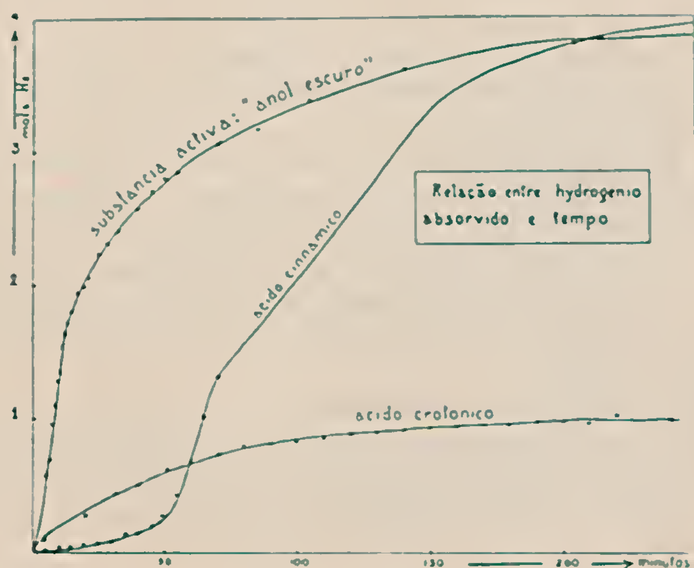
Em abril de 1937, Dodds e Lawson (1) indicaram que o p-propenyl-phenol ou anol, $HO.C_6H_4.CH:CH.CH_3$, em doses não superiores a 1 gamma, dava resultados positivos na prova de Allen-Doisy; do mesmo modo, o anol benzoylado, $C_6H_5.CO.O.C_6H_4.CH:CH.CH_3$, devia possuir um effeito semelhante. Esse effeito tão pronunciado da parte de uma substancia de constituição tão simples despertou, naturalmente, vivo interesse entre os chimicos especializados no campo dos hormonios, pelo que nós tambem resolvemos investigar o assumpto.

E' verdade, que, por motivos puramente theoricos, nos parecia pouco provavel que o anol pudesse ter um effeito physiologico semelhante ao da estrona. Como um de nós já provou ha alguns annos (2), é frequente acharem-se substancias chimicamente differentes, mas de effeito mais ou menos identico, que tenham pesos moleculares dentro da mesma ordem de grandeza: assim se dá com certos estimulantes, como a camfora, a hexetona, o cardiazol e a coramina, que, embora sejam chimicamente differentes, têm peso molecular muito parecido. No entanto, a estrona tem o peso molecular de 272, enquanto o anol, apenas o de 134. A' luz da theoria que acabamos de expor, era de esperar que, não propriamente o anol em si, mas provavelmente um anol bi-molecular possuisse aquelle effeito estrogenico.

Preparámos o anol pela desmethylização do anethol com o iodeto de ethyl-magnesio (3), evitando, porém, que o anol livre se pusesse em contacto com o ar; preparámos, em seguida, o benzoato com o proprio soluto. Como era de esperar, o derivado de benzoyla mostrou-se completamente inactivo (Experiencia 1).

No decurso de nossas investigações, appareceu uma nova communicação dos mesmos auctores ingleses (4), que mostrava ser uma impureza do anol, facilmente soluvel em chloroformio, responsavel pelo effeito, e não o anol em si. Por essa epoca, já tinhamos obtido em animaes estro completo na prova de Allen-Doisy pela acção de certos productos secundarios da preparação do anol. Certa vez, ao destillarmos o producto da transformação do anethol com iodeto de ethyl-magnesio directamente sob pressão commum, appareceu sob a forma de resina avermelhada uma fracção de ponto de ebullição mais elevado, a qual produziu em quantidades de 60 gamma, um estro perfeito em femeas de camondongo castradas. Determinámos o peso molecular dessa resina, que se mostrou, como aliás esperavamos, bi-molecular. Encontrámos apenas 261 (Experiencia 2), em vez de 268, como peso molecular.

A principio, suppunhamos que a substancia activa tivesse surgido pela juncção de duas moleculas de anol a combinar as duplas ligações da cadeia lateral e a formar um annel de 4 atomos de carbono, conforme se admitte para a polymerização do acido cinnamico em acidos truxillicos. Neste caso, seria necessario que occorresse a absorpção de 3 moleculas de hydrogenio na hydrogenação da substancia activa para cada meia molecula (PM = 134!). Baseando-nos nesse peso molecular, achámos 4 moleculas de hydrogenio, como mostra a curva abaixo, tendo as curvas de hydrogenação dos acidos crotonico e cinnamico sido igualmente determinadas para fins de comparação. Si esta interpretação com respeito aos valores obtidos para o peso molecular e a hydrogenação fosse exacta, a polymerização deveria ter certamente occorrido, de modo bem diverso.

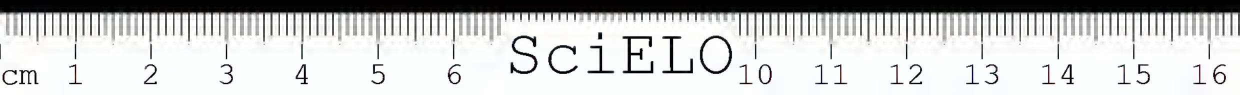


Em outras experiencias pareceu-nos tambem, a principio, que, com respeito ao polymerizado activo do anol, não se tratava da juncção de moleculas de anol com o auxilio de duplas ligações da cadeia lateral. Assim é que polymerizámos anethol com acido sulfurico concentrado e com chloreto de zinco, na esperança de desdobrar os grupos methylicos dos productos de polymerização e obter, em estado chimicamente puro, a substancia activa. Com acido sulfurico obtêm-se polymeros muito mais elevados, que contêm na molecula pelo menos 8 radicaes de anethol. Com chloreto de zinco obtêm-se os chamados iso- e meta-anethoes, os quaes reconhecemos como bi-moleculares. Os productos obtidos desse dimero com acido iodhydrico, pelo desdobramento do grupo methoxylico, davam bi-benzoatos oleosos, inactivos. Admittindo-se que os polymeros do anethol tenham surgido pela união no ponto das duplas ligações do anethol, estas experiencias pareciam falar a favor de uma polymerização de outro genero (Experiencias 3, 4 e 5).

Como segunda hypothese, verificámos si, pela deslocação da dupla ligação do anol, poderia surgir uma configuração chinoide, e si esta chino-propana se poderia reunir com uma nova molecula de anol para uma formação semelhante á quinhydrona. Isto nos foi suggerido especialmente pela côr vermelha, peso molecular e numero de duplas ligações na substancia activa. Purificámos o anol muito cuidadosamente através do seu benzoato e aquecemol-o no alto vacuo a 240°. Assim esperavamos obter uma polymerização de modo mais adequado e tambem um preparado mais puro.

Sob estas condições, deu-se realmente uma modificação do anol no sentido de se formar uma resina avermelhada, da qual se pode extrahir por destillação o anol em excesso. Infelizmente, esta resina não era uniforme. Uma parte se dissolveu em chloroformio, e a outra permaneceu insoluvel; e ambas as partes eram physiologicamente inactivas.

Finalmente, cremos ter encontrado uma solução para o nosso problema, applicando ao nosso caso a theoria apresentada em um trabalho de Serini & Steinruck (5), que acabamos de receber. A determinação do peso molecular de nossa substancia activa em canfora só pode ter dado um valor bem approximado, uma vez que a resina não estava completamente pura e uniforme. Si o peso molecular da substancia examinada tivesse sido 15% mais alto do que o encontrado, teria sido possivel fazel-o concordar com a nossa hypothese sobre a relação entre o effeito physiologico de varias substancias chimicas e a ordem de grandeza de seus pesos moleculares. Contando-se, porém, com um peso molecular mais elevado, a quantidade de hydrogenio absorvida já não corresponderá mais a 4, mas sim a mais ou menos 3 moleculas de hydrogenio. Os auctores que acabamos de citar, preparam, do mesmo modo que nós, o anol do anethol, mediante emprego de iodeto de ethyl-magnesio, e obtiveram como subproducto



uma fracção de ponto de ebulição mais elevado, da qual, mediante acetylação, obtiveram um producto crystallizado, $C_{26}H_{34}O_4$. Este é extraordinariamente activo e, segundo a opinião dos auctores comprovada pelas analyses, trata-se de um anol dimero, no qual ainda existem 2 radicaes de ethyla.

Ainda não podemos confirmar que a formula de constituição adoptada pelos pesquisadores alemães seja a mais acertada; queremos, porém, consideral-a apenas como provavel. Cremos que com aquella substancia activa tinhamos em mão um producto que correspondia ao obtido por elles, que, no entanto, puderam conseguir o producto natural em forma crystallina mediante acetylação.

Protocollo das experiencias

1. *Benzoato de anol*, $C_6H_5.CO.O.C_6H_4.CH{=}CH{-}CH_3$.

Aquece-se em um balão de um litro 8,1 gs. de aparas de magnesio, com 1 g. de iodo, sob constante agitação sobre a chamma. Depois de esfriar, addicionam-se 250 cc. de ether secco ao magnesio assim activado e, pingando-se 33 cc. de iodeto de ethyla gotta a gotta, prepara-se, como de costume, um soluto de iodeto de ethyl-magnesio. Depois da evaporação da maior parte do ether, aquece-se o balão num banho de oleo a uma temperatura de 100°, enquanto se deixam pingar 51 cc. de anethol. Para evitar a formação de espuma e solidificação da massa, addiciona-se o anethol bem vagarosamente durante o espaço de duas horas, elevando-se pouco a pouco a temperatura até 150°. O iodeto de methyla que se desprende na reacção é condensado num refrigerador descendente, e captado. Uma vez que não se formem mais vapores brancos, deixa-se esfriar o balão e addicionam-se 200 cc. de ether. Sob refrigeração com gelo, decompõe-se o sal de iodeto de magnesio do anol com 1-N acido sulfurico e um pouco de gelo.

Extrahe-se novamente, sob completa refrigeração, o anol do soluto etherico com 350 cc. de 1/N potassa caustica e trata-se immediatamente o soluto alcalino de anol com chloreto de benzoyla. O benzoato de anol assim obtido fundiu primeiramente a 120°, e a 124°C. depois da quarta e quinta recrystallização em alcool.

2. *Transformação do anol puro em substancia activa.*

a) *Preparo e actividade da substancia.* Como ficou acima descripto, si não se tem o cuidado, porém, de evitar o contacto da substancia phenolica com o ar e de a transformar no benzoato, obtem-se o anol como um oleo amarellado, aromatico ao aquecer. Na destillação ao vacuo de 60 mm. passava, desde 240° até 300°, uma fracção que deixámos parada em balão aberto, com o que se

tornou escura, solidificando-se ao estado de resina. Depois de duas semanas de repouso, foi seccada e moida e uma quantidade determinada, dissolvida em oleo de sesamo para as determinações physiologicas (prova de Allen-Doisy).

A substancia foi administrada a femeas de camondongo castradas em 6 doses de 0.3 cc. de oleo, uma por dia. As quantidades de 60, 80, 90 e 100 γ deram resultados positivos na prova de Allen-Doisy. (Dr. Thales Martins).

b) *Determinação do peso molecular.* Foram pesados na micro-balança 1,123 mgs. de "anol escuro", 11,902 mgs. de canfora, obtendo-se, segundo o methodo de Rast (6), um peso molecular de 261, o qual se approxima a duas vezes o do anol = 134 × 2 = 268.

c) *Hydrogenação.* Para experimentar o methodo e apparelho de Slotta e Blanke (7) procedemos á hydrogenação de duas substancias que mostravam uma ligação dupla aliphatica e uma aliphatica + 3 aromaticas, obtendo os seguintes resultados:

...stancia	Formula	Peso molec.	Catalysador	Solvente	Tempo (minutos)	Pressão barometr.	Temperatura	Vol. H_2	Mols. de H_2 Calculadas	Mols. de H_2 Achadas
...crotonico ... mg.	$CH_3-CH=CH-COOH$	86.05	Pt colloid. 16.097 mgs.	Acido acetico	200	698,50	24,8	1,075	1	0,99
...namico ... mgs.	$C_6H_5-CH=CH-COOH$	132	Pt colloid. 41.90 mgs.	Idem	360	701.45	21,8	3,663	4	4,15
...escuro ... mgs. ...ydr... ...Steno...	$(HO-C_6H_4-CH=CH-CH_3)_2$ $HO-C_6H_4-CH-HC(C_2H_5)-CH_3$ $HO-C_6H_4-CH-HC(C_2H_5)-CH_3$	268 326	PtO_2 18,97 mgs.	Idem	215	706,10	25,0	2,581	4 3	4,06 3,26

Donde se poderia deduzir que a ligação dupla na cadeia lateral não foi atacada pela polymerização (Vide esclarecimento na parte theorica).

3. *Polymerização do anethol com acido sulfurico.*

Obtém-se dois polymeros, "anisoinas", cujo peso molecular não se acha indicado na literatura. A uma mistura ainda quente de 18 cc. de acido sulfurico concentrado com 5 cc. de agua, addicionamos 6 cc. de anethol com 6 cc. de alcool absoluto. Obtivemos u'a massa amarella da qual conseguimos separar duas fracções pela differença de solubilidade em ether, com os pontos de fusão de 140-142° e acima de 250°. O peso molecular era de cerca de 8 vezes o do anethol.

2,31 mgs. de anisoina (p. f. 140-142°) em 51,15 mgs. de exaltona (cyclopentadecanona) differença dos pontos de fusão = 0,5°; peso molecular encontrado = 2452; peso molecular calculado para 8 vezes o do anethol = 2584.

4. *Polymerização do anethol com chloreto de zinco.*

10 gs. de chloreto de zinco foram dissolvidos em um pouco de agua e addicionados de 20 gs. de anethol. Depois de se tratar a mistura com vapor superaquecido (até 180°), obteve-se um oleo grosso que foi dissolvido em 40 cc. de benzol; ao soluto aquecido juntaram-se 40 cc. de alcool absoluto e a mistura na geladeira deu um precipitado branco que, depois de duas recrystallizações mostrou um p.f. de 134-135° que foi descripto para o metanethol.

Ao soluto-mãe addicionaram-se mais 40 cc. de alcool absoluto, a quente, o que deu logar a nova precipitação de metanethol + oleo. Decantou-se o soluto e tratou-se o precipitado com 50 cc. de alcool frio, que dissolveu o oleo, deixando o metanethol. O soluto do oleo em alcool collocado na geladeira agora precipita primeiro o oleo e, depois de dois dias, forma crystaes nas paredes, de metanethol. O oleo decantado, tratado novamente com alcool, se dissolve a quente deixando o metanethol.

Rendimento: 2,5 gs. metanethol puro
2 gs. de oleo puro.

Determinação do peso molecular.

5,21 mgs. metanethol em 52,4 mgs. de canfora

Differença dos pontos de fusão I° 16° = peso molecular 244
II° 14° = " " 261

505 : 2 =

Media = 253.

Peso molecular encontrado = 253.

Peso molecular calculado para 2 x anethol = *298*.

5) *Preparação dos benzoatos dos iso- e meta-dianoes.*

Ambos os productos de polymerização foram tratados com HI para scindir o grupo methylico e formar os dianoes.

1 g. do dimero + 10 gs. HI + 0,2 gs. phenol (para solubilizar a substancia) + 0.1 g. phosphoro vermelho tratados a 140-150°. Nos vapores que sahiram durante a reacção pudemos verificar CH_3I. A massa, depois de fria, foi extrahida com ether; o ether, com soluto de soda caustica; e este, tratado com chloreto de benzoyla, para formar os benzoatos. Ambos os benzoatos eram substancias oleosas, sendo que o dibenzoato de iso-dianol, ao seccar, deu uma resina quasi solida e o meta-dianol, um oleo grosso.

Na prova physiologica, os benzoatos se mostraram inactivos em doses de 100 gammas.

RESUMO

Provou-se como certa a hypothese, baseada em raciocinios puramente theoricos, de que a substancia com actividade estrogenica, obtida do anol, é um producto bi-molecular. Das experiencias de polymerização do anethol resultou que, com o chloreto de zinco, se obtêm productos bi-moleculares, enquanto que o tratamento com acido sulfurico fornece productos com cerca de 8 vezes o peso molecular. O producto activo, approximadamente bi-molecular, não pode ser obtido por desmethylização do anethol bi-molecular. Portanto, a substancia estrogenica representa um dimero, formado de modo diverso do obtido pela condensação com chloreto de zinco.

A formula proposta por Serini e Steinruck para um preparado semelhante, acetylado e altamente activo, parece bem acceitavel, pois ainda estão de accordo com ella os resultados da micro-hydrogenação e da determinação do peso molecular de nosso preparado activo, bi-molecular. Portanto, o anol bi-molecular, altamente activo, provavelmente tambem surgiu, nestas experiencias, com a desmethylização do anethol pelo iodeto de ethyl-magnesio, pela addição de dois radicaes ethyla ao dimero formado.

ZUSAMMENFASSUNG

Die aus theoretischen Ueberlegungen aufgestellte Hypothese, dass die aus Anol erhältliche oestrogen-wirksame Substanz ein dimolekulares Produkt darstellt, erwies sich als richtig. Die Untersuchung der Polymerisation von Anethol ergab, dass nur mit Zinkchlorid dimolekulare Produkte entstehen, während mit Schwefelsäure Substanzen vom ungefähr achtfachen Molekelgewichte gebildet werden. Das aktive, ungefähr dimolekulare Produkt lässt sich aber durch Entmethylierung des dimolekularen Anethols nicht gewinnen. Die oestrogen-wirksame Substanz ist also durch Zusammenlagerung zweier Anol-Moleküle in anderer Weise entstanden, als bei der Zinkchlorid-Kondensation. Die Formel von Serini und Steinruck für ein ähnliches, acetyliertes, hochaktives Präparat ist sehr wahrscheinlich. Auch die Ergebnisse der Mikrohydrierung und Molekulargewichts-Bestimmung unseres aktiven dimolekularen Präparates aus Anol lassen sich mit diesem Formel-Bild in Einklang bringen. Das dimolekulare, hochaktive Anol ist also höchstwahrscheinlich bei der Entmethylierung des Anethols mittels Aethyl-magnesium-jodid auch in unseren Versuchen in der Weise entstanden, dass zwei Aethyl-Reste miteingelagert wurden.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Dodds, E. C. & Lawson, W.* — Nature 139:627.1937.
2. *Slotta, Carlos H.* — Grundriss der modernen Arzneistoff-Synthese. Stuttgart 1931, Ed. Ferdinand Enke, p. 139.
3. *Spaeth, E.* — Monatshefte f. Chemie 35:626.1914.
4. *Dodds, E. C. & Lawson, W.* — Nature 139:1068.1937.
5. *Serini, A. & Steinruck, K.* — Naturwissenschaften 42:682.1937.
6. *Rast, K.* — Ber. dtsch. chem. Ges. 55:1051 e 3727.1922.
7. *Slotta, Carlos H. & Blanke, E.* — J. f. praktische Chemie 143:3.1935.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimentaes do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937.



612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA CHIMICO

1. Determinação do extracto e da cafeina

POR

C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Introducção

A composição chimica e a acção physiologica do café como uma das bebidas mais apreciadas pelo homem, têm sido, já ha mais de cem annos, objecto de estudo dos scientistas. Infelizmente, faltou muitas vezes, para a solução do problema, a collaboração do chimico com o physiologista, tendo cada um procurado resolver estas difficeis questões separadamente, e com recursos totalmente inadequados. Desta maneira, originou-se a grande confusão que encontramos hoje na literatura, acerca das acções physiologicas do café; ficou-se conhecendo, com certeza, apenas um unico facto: que a acção da cafeina não é identica á do café. As acções da cafeina são bem conhecidas e descriptas, enquanto as opiniões sobre a acção do café são grandemente contradictorias.

Enorme deve ser, portanto, o interesse pelas substancias, que, a par da cafeina, ainda se encontram no café, substancias essas sobre as quaes, até hoje, pouco ou nada se sabe, tanto sob o ponto de vista chimico, como do physiologico. Reconhecel-as, classifical-as chimicamente e, si possivel, determinal-as quantitativamente, deve ser nosso escopo. E' preciso para isso, porém, que se tenha uma orientação exacta sobre o conteúdo das substancias, ou melhor, grupos de substancias, bem conhecidas na infusão do café: cafeina e elementos solidos, que representam o extracto aquoso.

Estando no primeiro plano das nossas investigações o organismo humano e a acção do café sobre elle, era natural que examinassemos bebidas, preparadas á maneira daquelle que o brasileiro toma diariamente. O interessante e surprehendente é que, ao que saibamos, taes determinações do extracto de cafeina

não tenham sido feitas por via simples em bebidas usuaes; só assim se explica o facto de termos chegado a resultados inteiramente novos, dos quaes trataremos neste artigo.

Dados geraes

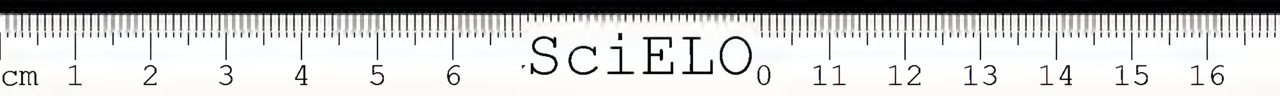
Os methodos para determinação do conteúdo de cafeina no café e na infusão, bem como os methodos para determinação do extracto numa bebida, foram estabelecidos na Europa, sendo, pois, adaptados ás condições de lá: em geral, prepara-se na Europa um café de 26 a 50 gs. de grão para 1 litro de agua. Todavia, o brasileiro bebe um café mais forte, cuja concentração oscilla entre 100 a 200 gs. de pó por litro de agua. Vimo-nos, pois, obrigado a adaptar os methodos de determinação ás nossas condições de bebidas, o que conseguimos por meio de pequenas modificações, com simplificação da technica já existente, segundo se verá na parte experimental.

Para evitar resultados eventuaes, conforme poderia acontecer si escolhessemos apenas um determinado typo de café, empregamos exclusivamente uma mistura em partes iguaes de 5 differentes qualidades communs em S. Paulo (União, Metropole, Serra, Jardim, Paraventi). Esses cafés tinham sido comprados no mesmo dia, no estado torrado e moido; sua mistura tinha as seguintes constantes analyticas:

Conteúdo de agua:	5,5%
Conteúdo de cafeina, calculado em café não seccado: . .	0,88%
(valor medio de 4 determinações)	
Conteúdo de substancias extrahiveis por agua:	23,92%
(segundo o methodo do "Handbuch der Lebensmittelchemie", VI, 32).	

Para verificar si, com a nossa escolha das concentrações, acertámos as condições aqui usuaes, arranjámos bebidas de 12 differentes cafés da cidade, misturámol-as e observámos: 1.° que a concentração da mistura se achava dentro dos limites das nossas experiencias; 2.° que o café geralmente empregado correspondia quasi exactamente á nossa mistura, quanto á proporção entre o teor do extracto e o da cafeina.

A preparação das infusões estava a cargo da mesma pessoa, tendo sido sempre uniforme, de modo que tambem aqui se excluiram variações; obedeceu inteiramente á maneira pela qual o café é geralmente preparado no Brasil. Nossas experiencias levam-nos a suppôr que os valores absolutos do conteúdo de cafeina e do extracto mal se modificariam com outros processos de preparação. Com isso não se alterará, certamente, a relação desses valores entre si. Como essa relação é essencial para as nossas conclusões, parece caber uma importancia especial aos resultados que obtivemos.



As bebidas foram preparadas sempre com a mesma quantidade de agua (230 cc.), fazendo-se mudanças de concentração por meio de variação das quantidades de pó empregadas na preparação das bebidas (de 20 a 65 gs., com differenças de 5 a 5 gs.). Assim se conseguiu que a quantidade do liquido a filtrar fosse sempre a mesma.

Parte experimental

A seguir descrevemos summariamente os methodos por meio dos quaes obtivemos os resultados acima mencionados. Os valores sobre os quaes se baseiam as curvas são todos valores medios, de, pelo menos, duas determinações. Seria longo demais citar aqui os resultados isolados que montam a mais de 50; limitamo-nos, pois, á descripção dos methodos e ás indicações dos seus limites de erro:

Conteúdo de agua no pó — 100 gs. da mistura de partes iguaes de 5 qualidades de café foram seccados na estufa a 100° até o peso constante. A perda de peso importou em 5,5 gs. = 5,5%.

Conteúdo de cafeina no pó — As determinações foram executadas precisamente segundo o methodo de Grossfeld e Steinhoff (Ztschr. f. Unters. d. Lebensm. 1931, 33). Resultou para a mistura (valor medio de 4 determinações, relativo ao café não seccado): 0,88% de cafeina ± 0,02%. O limite de erro do methodo importa, portanto, em cerca de 2% do valor absoluto.

Extracto aquoso do pó — A determinação foi feita pelo methodo do Handbuch der Lebensmittelchemie, VI, 32. Resultado da mistura: 23,92%.

Conteúdo de cafeina nas bebidas — A applicação do methodo de Jesser (Handbuch der Lebensmittelchemie VI, 41) causou-nos difficuldades. A extracção das bebidas alcalinizadas por meio de chloroformio conduziu a emulsões difficilmente separaveis. Observamos que a quantidade recommendada de soluto alcalino (20 cc. de uma solução de soda caustica a 2%) era fortemente excessiva e que, empregando apenas 8 cc. dessa solução, se podia tambem extrahir a cafeina completamente, sendo fracamente alcalina a reacção com phenolphtaleina. Como não dispunhamos de extractores para chloroformio, procuramos um dissolvente mais leve do que a agua, visto que extractores para taes liquidos sempre se podem arranjar: verificamos ser o benzol puro (p.e.78°) o dissolvente apropriado. Quando se formavam emulsões no extractor, estas eram separadas facilmente por meio de addição de algumas gottas de alcool. A extracção da cafeina attinge o seu termo quando o dissolvente escorre descorado, o que em regra se



dava depois de 3 horas no maximo. O tratamento continuava, então, conforme o methodo de Grossfeld e Steinhof (V. acima). Ás vezes verificamos ser necessario addicionar algumas gottas a mais do que os 5 cc. recommendados de soluto de thiosulfato, para obter descoloração completa do excesso de permanganato. O limite de erro deste methodo acha-se a cerca de 2% do valor absoluto; como, porém, os valores absolutos são tão baixos (entre 0,070 e 0,195%), trata-se, nas discordancias, somente de millesimos por cento dos valores relativos.

Exemplo: Bebida 5 (25 gs. de pó para 230 cc. de agua) deu, em 2 determinações, respectivamente, 44,4 e 44,8 mgs. de cafeina, correspondentes respectivamente a 0,089 e 0,090% de cafeina.

Determinação do extracto na bebida — Para isto evaporamos numa capsula, da maneira mais simples, exactamente 10 cc. da bebida, no banho-maria, seccando depois a capsula durante 5 horas na estufa, a 100°. Depois desse tempo o peso era constante. O limite de erro do methodo é menor do que 1%. *Exemplo*: Bebida 4 (60 gs. de pó para 230 cc. de agua) deu 0,6605 e 0,6561 gs. de extracto, correspondentes a 6,60 e 6,56% respectivamente.

Tentando determinar o conteúdo do extracto aquoso por meio de evaporação da agua no vacuo, encontramos, por um lado, difficuldades, devido ao forte espumar das soluções (que se pode evitar com addição de uma pequena quantidade de alcool estearico), e não chegamos, por outro lado, a resultados concordantes, pois que, apparentemente, além de agua, ainda se evaporam outras substancias no vacuo, provavelmente productos da torrefação.

Preparação das bebidas — Em todos os casos adoptamos o seguinte processo: 230 cc. de agua eram aquecidos á ebulição, numa capsula aberta de porcellana, sobre um fogareiro electrico; addicionavam, então, a quantidade de pó exactamente pesada, mexendo a mistura que se deixava ferver precisamente um minuto. Depois filtravamos o todo immediatamente, a quente, através de um coador previamente humedecido; a bebida assim preparada era medida, depois de fria, numa proveta, sendo logo depois levada à determinação.

Resultados

De antemão era de esperar que com uma certa quantidade de agua e uma pequena porção de pó de café se obteria mais bebida do que com a mesma quantidade de agua e maior porção de pó. E' evidente que uma grande massa de borra não dissolvida, mas muito fina, retem, ao filtrar pelo coador, mais solução aquosa do que uma pequena porção de residuo bem extrahido. E' porém, surprehendente que esta dependencia seja tão pronunciada, como resulta de Fig. 1. Vê-se que, com o emprego de 65 gs. de pó de café, se obtêm só 2/3 da

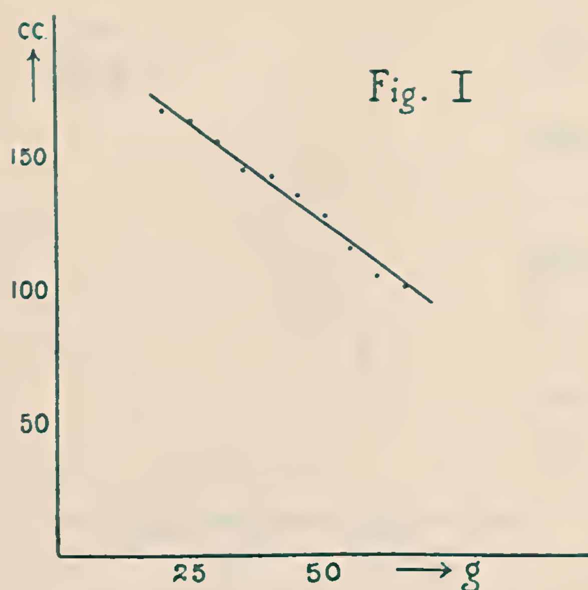


Fig. I
Rendimento de bebida, em relação à quantidade de pó empregada.

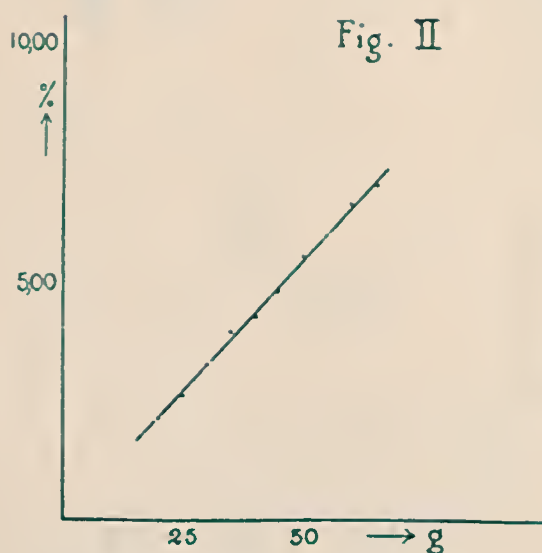


Fig. II
Porcentagem de extracto em relação à quantidade de pó empregada.

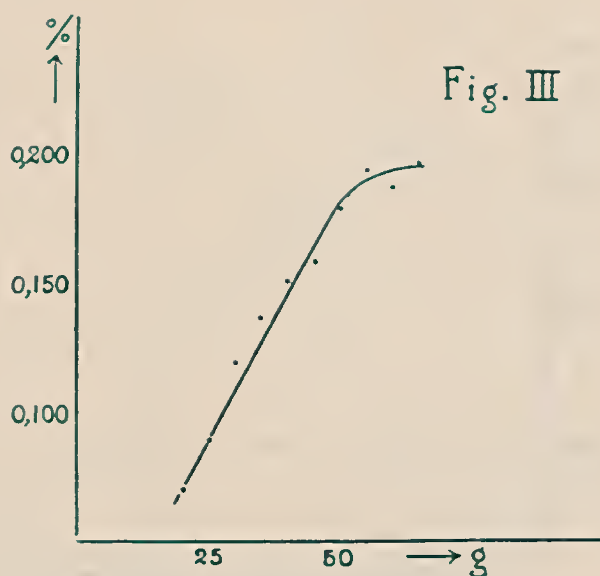


Fig. III
Porcentagem da cafeina na bebida.

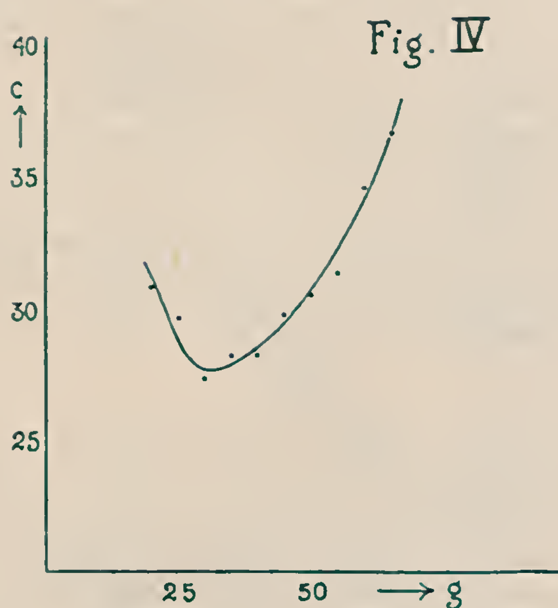


Fig. IV
Proporção entre a porcentagem do extracto e a porcentagem da cafeina.

quantidade de liquido que se obtêm com 20 gs., pondo-se de margem, naturalmente, o facto de se ter no 1.º caso uma bebida de maior valor quanto ao sabor e riqueza em substancias. A differença é linear, isto é, o rendimento da bebida é inversamente proporcional á quantidade de café empregada.

A Fig. 2 mostra que a porcentagem do extracto se eleva de modo proporcional á quantidade de café empregada, pelo menos dentro dos limites das infusões que examinamos. A Fig. 3, porém, indica que é differente a porcentagem da cafeina, que tende a attingir logo um maximo nas bebidas mais concentradas, dobrando-se depois a curva. Esse maximo é attingido com uma concentração de 55 gs. de café por 230 cc. de agua, o que corresponde ao que se chama um bom café. Em concentrações mais altas, a porcentagem da cafeina não augmenta mais, conservando-se constante.

Relacionando a porcentagem de extracto á porcentagem de cafeina, isto é, estabelecendo uma proporção % de extracto: % de cafeina, obtemos uma curva muito caracteristica indicada na Fig. 4. A linha percorre um minimo pronunciado, sob uma concentração de 30 gs., para depois subir fortemente. Isto resulta de que, com o augmento da concentração, se eleva uniformemente a porcentagem do extracto, enquanto que a da cafeina logo attinge o seu maximo, de modo que a proporção se desloca sempre mais a favor da porcentagem do extracto.

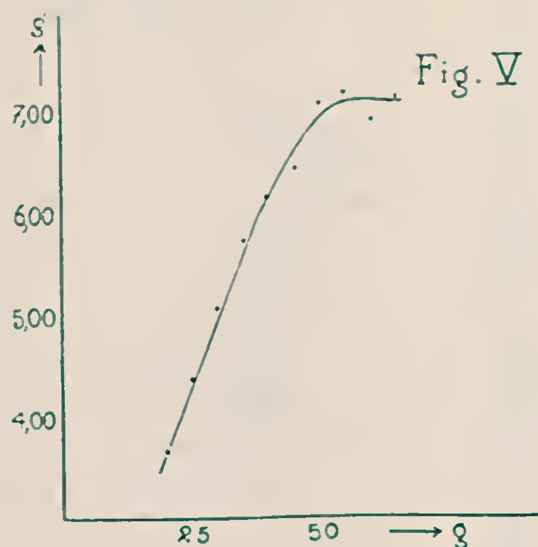


Fig. V
Quantidade total de extracto na bebida.

Registando o total em grammas da bebida obtida e o total das quantidades de cafeina e extracto nella contidas, obtemos as curvas das Figs. 5 e 6. Estas mostram a grande influencia que o augmento da concentração exerce sobre o

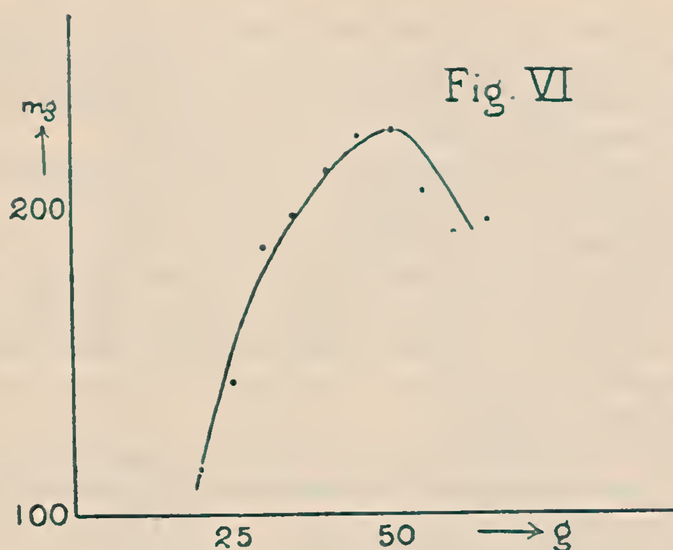


Fig. VI
Quantidade total da cafeina na bebida.

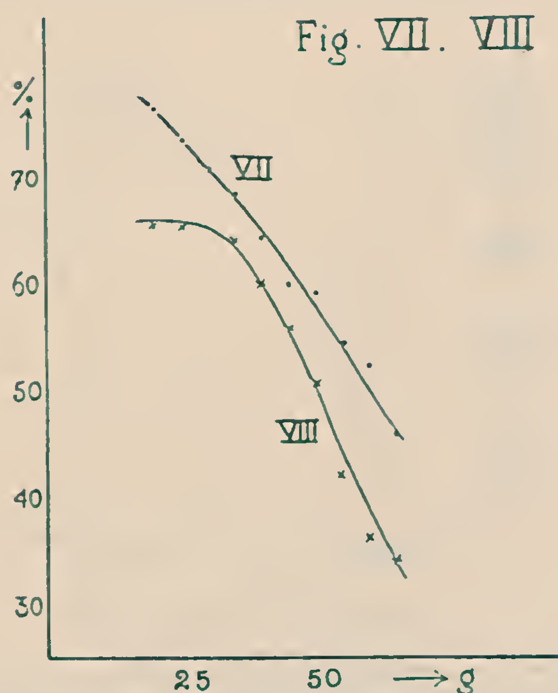


Fig. VII — Rendimento percentual do extracto.
Fig. VIII — Rendimento percentual da cafeína.

rendimento da bebida, diminuindo-o: enquanto (Figs. 2 e 3) *porcentualmente* augmenta, com concentração crescente, quer o conteúdo de extracto, quer o da cafeina, as *quantidades totaes* attingem, em ambos os casos, um maximo, que, contudo, é mais pronunciado quanto ao da cafeina, pois é obtido sob uma concentração menor.

Interessante é ainda a questão: que porcentagem de agua e de substancias extrahiveis por agua contidas no pó se torna a encontrar na bebida? A resposta a essas perguntas é dada pelas curvas das Figs. 7 e 8. Estas mostram que o rendimento do extracto sempre é um pouco maior do que o da cafeina, em escala especialmente pronunciada nas bebidas mais concentradas, resultado esse que concorda perfeitamente com a Fig. 4, relativa á proporção das porcentagens.

Surge agora a questão de saber qual a importancia que os resultados mencionados e as curvas delles têm na pratica.

Aqui no Brasil, ao contrario da Europa e da America do Norte, o café não é usado apenas como estimulante, mas tambem como alimento. E' superfluo frisar que o valor nutritivo da bebida depende directamente das substancias solidas nella contidas: Fig. 2 mostra que o valor nutritivo augmenta sempre, acompanhando de perto a concentração. Quando se quer, pois, aproveitar o café como alimento, deve-se preparar com a maior quantidade possivel de pó, tanto mais quanto da curva representada na Fig. 3 resulta que, desse modo, o café, mesmo nas mais fortes concentrações, não trás o risco de se tomar demais cafeina. A partir da concentração de 55 gs. de pó para 230 cc. de agua, o conteúdo de cafeina não augmenta mais: enquanto isso, nas bebidas mais fortes o conteúdo de substancias nutritivas e estimulantes continua a augmentar, como se vê pela comparação da Fig. 2. E' este o sentido da tão caracteristica curva da Fig. 4: a proporção de extracto em relação á cafeina augmenta fortemente á medida que cresce a concentração; ou, em resumo, a proporção de substancias nutritivas e estimulantes, comparativamente com as substancias "toxicas" torna-se cada vez mais favoravel nas bebidas mais fortes. Além disso o facto de, nas bebidas fortes, occorrer um aproveitamento relativamente melhor das substancias extractivas do café em relação á cafeina (como o mostram comparativamente as curvas 7 e 8) confirma as conclusões acima tiradas.

A principio já se mencionou que o unico facto certo sobre a acção physiologica do café era que esta é diversa da acção da cafeina. Enquanto que a cafeina isolada, quando applicada em doses maiores, é capaz de exercer uma acção toxica, na bebida do café não se observam claramente nem symptomas agudos, nem chronicos de intoxicação, pelo menos no organismo do homem são. Pelo con-

trario: o uso do café produz subjectivamente apenas symptomas agradaveis, maior vivacidade e mobilidade, dissipação do cançaço, augmento da capacidade de acção do corpo e do espirito. A causa de todas estas acções favoraveis encontra-se nas substancias extractivas aquosas do café, sendo que de nossas experiencias resulta que se ingere tanto maior quantidade destas substancias quanto mais forte se toma o café. Deste modo, fica confirmada scientificamente a experiencia do apreciador de café, para quem um café forte, não só tem melhor sabor, como é muito mais poderoso na sua acção estimulante.

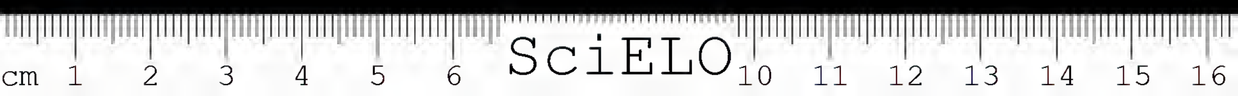
RESUMO

Em minuciosas determinações feitas sobre a cafeina e sobre o extracto contidos em bebidas de concentrações diversas de café, foi obtido o seguinte resultado pratico: ao passo que o teor em materias extrativas augmenta proporcionalmente nas bebidas mais concentradas, o teor em cafeina nestas attinge logo um maximo. Isto pode ser attribuido ao facto de que a grande quantidade de pó de café, empregada nas bebidas mais fortes, retém muita cafeina. E significa que, num café forte, se aproveitam as materias extractivas de valor nutritivo e estimulante, porém não se ingere a cafeina contida em grandes quantidades e que talvez seja prejudicial á saude.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden genaue Bestimmungen des Extrakt-und Coffeingehaltes in Getraenken von verschiedener Konzentration durchgefuehrt. Das praktische Ergebnis ist: Waehrend in den staerker konzentrierten Getraenken der Gehalt an Extrakt-Stoffen gleichmaessig zunimmt, erreicht der Gehalt an Coffein ein Maximum. Der Grund dafuer ist darin zu suchen, dass die grosse Menge Kaffeepulver, die man bei den staerkeren Getraenken verwendet, so viel Coffein zurueckhaelt, dass der Coffeingehalt im Getraenk niemals ueber ein bestimmtes Mass hinausgeht. Dies bedeutet, dass man in einem starken Kaffee zwar die fuer Ernaehrung und Anregung wichtigen Extraktiv-Stoffe in erhoehtem Masse zu sich nimmt, nicht aber das in grossen Dosen vielleicht schaedliche Coffein.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em março de 1937. Dado á publicidade em outubro de 1937).



612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA CHIMICO

2. Alcaloides do café

POR

C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Introducção

Em todas as plantas e partes essenciaes dos vegetaes se encontram, além de componentes quasi indifferentes, certos acidos e bases que possuem especial interesse. O grão de café contém, além de outros, principalmente acido tannico, tambem o chamado acido chlorogenico, que parece ser de maxima importancia para o gosto do café. Em um dos proximos artigos, trataremos mais de perto da relação entre os acidos e especialmente entre o teor do acido chlorogenico e o gosto do café, á luz de nossas proprias experiencias.

Talvez mais importante ainda do que os *acidos* do grão do café sejam as *bases* nelle contidas, isto é, as materias organicas azotadas, pois é a ellas que o *café deve seu effeito estimulante. Em geral, o chimico considera como alcaloides* aquellas bases vegetaes que têm um effeito physiologico mais ou menos pronunciado, sendo que a este grupo pertencem tambem certos remedios importantes, taes como a quinina, a morphina e a cocaina.

Dos alcaloides do café conhecemos por enquanto três: a cafeina, a trigonellina e a cholina; destas a cafeina, $C_8H_{10}N_4O_2$, é a mais importante. Ella é encontrada, na porcentagem de 1, de um modo geral, no nosso café e possue o effeito physiologico mais intenso. Justamente sua acção estimulante sobre o corpo e o espirito é o que procuramos ao ingerirmos o café. O café que contém cafeina torna as pessoas mais activas e bem dispostas, enquanto que o alcool as entorpece e cança.

Café sem cafeina

No entanto, seria incorrer em erro pensar que o café fosse representado por um soluto de cafeina; quem assim pensa faz um mau conceito do delicioso producto, pois o café integral é mesmo muito mais rico em materias importantes do que geralmente se acredita.

Influenciadas por uma propaganda medica errada e tendenciosa contra a cafeina, muitas pessoas chegaram a ter um receio exaggerado do café. Para provar a sem razão desse receio basta dizer que na Pharmacopéa alemã não está mais prescripto nenhum limite maximo para a dose da cafeina, conforme acontecia antigamente, ao passo que para todos os outros alcaloides em voga ainda se faz tal prescripção. Todavia, graças a tal propaganda medica, seguida pelo fabrico de café isento de cafeina, por parte de firmas interessadas no monopolio daquelle alcaloide e na collocação do producto nelle desprovido (café descafeinado), muitas pessoas normaes que haviam passado a ter um medo excessivo e injustificado do café integral, bem como algumas outras, fracas ou cardiacas que não o bebiam, passaram todas a consumir esta bebida, embora sob a nova forma. Este facto contribuiu indirectamente para o augmento do consumo global do café.

Principios activos do café

Voltemos, porém, ao assumpto e indaguemos por que motivo o café livre de cafeina tem effeito estimulante sobre os nervos e os intestinos. Estarão em jogo os outros dois alcaloides? A cholina, $HO.CH_2.CH_2.N(CH_3)_3.OH$, encontrada no nosso café no proporção de 0,02%, passará com certeza, integralmente para a bebida do café. De qualquer modo, sabemos que ella estimula o movimento intestinal e que uma parte do sabor do café é devida, quasi certamente ás minimas quantidades deste alcaloide.

Muito mais importante, porém, é no café o conteúdo de *trigonellina*, $C_7H_7NO_2.H_2O$, embora pouco saibamos ainda sobre os effeitos deste alcaloide. Tal como a cholina, a trigonellina e seus saes são muito facilmente soluveis em agua quente; assim, na preparação do café, passa esta substancia de maneira muito mais completa do que a cafeina. Da cafeina contida no pó de café se encontra sómente a metade na bebida e, como accentuamos em nosso 1.° artigo, ainda proporcionalmente se encontrará della muito menor quantidade nas bebidas concentradas, isto é, preparadas com muito pó e pouca agua. Mesmo que no café a proporção da trigonellina fosse apenas 1/3 da cafeina, o café prompto para bebida poderia apresentar, sob taes circunstancias e por causa desta differença de solubilidade que é maior na trigonellina do que na cafeina, um teor approximadamente identico destes dois alcaloides.

A proposito destas observações, temos feito uma verificação muito mais minuciosa do que jamais se tentou até hoje: a extracção preparatoria é obtida por nós na Secção de Chimica do Instituto, enquanto a pesquisa physiologica, conduzida pelo prof. Thales Martins na Secção de Physiopathologia, visa a influencia da trigonellina sobre os diversos organs do corpo.

A trigonellina encontra-se não sómente no grão de café, como tambem noutras plantas e sobretudo em sementes. Foi descoberta em 1885 na semente de *Trigonella* (1). Em 1886, a methylbetaina do acido nicotinico foi obtida syntheticamente e, em 1887, foi verificado que este producto synthetico é identico á trigonellina natural (3). Mais tarde, em 1894, se encontrou a mesma substancia no grão de café, sem que se provasse a sua identidade com a trigonellina. O descobridor denominou este novo alcaloide "cafearina" (4) e suas conclusões, a principio postas em duvida, foram (10) confirmadas, 15 annos mais tarde, por outros.

Em 1910, finalmente, pela primeira vez se suspeitou que a cafearina poderia ser identica á trigonellina (8), o que foi comprovado sómente em 1931 (9). A cafearina, isolada do café da Guatemala, foi comparada com a trigonellina de todas maneiras possiveis; além disto, foram feitas com esta "cafearina" as mesmas experiencias que já tinham sido realizadas muito antes (2) para a obtenção da trigonellina synthetica. Não ha, pois, duvida alguma de que a cafearina não é outra cousa do que a trigonellina, isto é, a methylbetaina do acido nicotinico.

No numero de setembro de 1936 da "Revista do D. N. C." appareceu um artigo sobre "Cafearina": "historico, pesquisa e caracterização", por Oscar Ribeiro, que affirmou ter conseguido mais uma vez insular este alcaloide (aliás em pequenissima quantidade), demonstrando, assim, não ter talvez conhecimento dos dados publicados já em 1935, a respeito da materia. A formula bruta por elle novamente representada como sendo $C_{14}H_{16}O_4N_2$, com uma molecula de agua de crystallização, deve ser mudada para $C_7H_9O_3N$. Disse esse auctor que esperava continuar o estudo, por pretender, não só verificar a formula bruta, como tambem observar a acção da "cafearina" na economia animal, de sorte que não considerava terminado o trabalho. De nossa parte, concordamos com esse ponto de vista, pois trabalhamos com a mesma finalidade.

As citadas experiencias com a trigonellina foram-nos facilitadas, por termos podido conseguir praticamente a quantidade necessaria, extrahindo-a do café, ou preparando-a syntheticamente. Antigamente se fazia a extracção da trigonellina do café por meio do leite calcificado e, mais tarde, por acido sulfurico diluido; modernamente, conseguiu-se quasi integralmente o mesmo resultado por meio de vapor d'agua sob pressão (10). Por nos faltarem as autoclavas necessarias, preferimos a fabricação puramente synthetica por intermedio da nico-



tina que, sobre o acido nicotinico, produz trigonellina purissima. Por este processo já obtivemos quantidades necessarias deste interessante alcaloide, assim como sua pesquisa physiologica já foi realizada com exito. Por outro lado, para o problema da trigonellina no café, seria de desejar um novo methodo, mais simples, com o qual se pudessem comparar as diversas qualidades de café, determinando-se suas differenças em conteúdo de trigonellina. Voltaremos em outro trabalho, a falar sobre estes novos methodos e principalmente a respeito dos successos alcançados com elles.

Nosso serviço obedece a tres finalidades principaes:

1.ª Estabelecer base scientifica para a propaganda do uso do café: 2.ª Melhorar o gosto de certas qualidades do café: 3ª. Descobrir um meio technico com que se consiga evitar a queima da enorme superproducção de café, que deverá ser racionalmente applicada na criação de novas industrias.

Para alcançar estes fins, é absolutamente necessaria a previa solução de tres problemas: 1.º Obter methodos para determinar, com facilidade e exactidão, a quantidade de cada elemento constitutivo das varias qualidades de café. 2.º Produzir as substancias chimicas principaes do grão de café sob a forma mais pura e na quantidade necessaria para que sua utilização chimica e technica possa ser investigada. 3.º Possibilitar o exame physiologico, em separado e em conjuncto, dos componentes essenciaes, sob o ponto de vista do sabor, da acção euphorica e do effeito estimulante.

RESUMO

Aponta-se em primeiro logar a importancia das bases contidas no café: cafeina, trigonellina e cholina. Corrige-se o conceito erroneo sobre a preparação do café isento de cafeina: o uso do café isento de cafeina não tem produzido uma diminuição, mas, pelo contrario, um augmento no consumo mundial do café em geral. Pouca attenção tem-se dado até o presente á importancia da trigonellina, cuja historia é rapidamente descripta. A cafearina é identica á trigonellina. Descrevem-se as possibilidades do preparo e da analyse da trigonellina.

ZUSAMMENFASSUNG

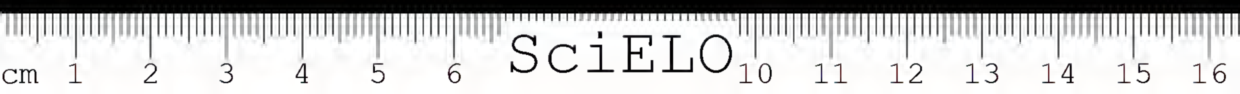
Es wird zunaechst auf die Bedeutung der im Kaffee enthaltenen Basen im Allgemeinen hingewiesen: Coffein, Trigonellin und Cholin. Die haeufig falsche Bewertung der Herstellung von coffein-freiem Kaffee wird richtig gestellt. Der coffein-freie Kaffee bedeutet nicht eine Herabsetzung des Konsums von Kaffee ueberhaupt, sondern hat zu einer zusetzlichen Steigerung des Welt

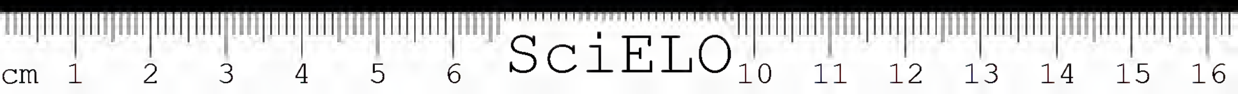
konsums gefuehrt. — Bis heute noch viel zu wenig beachtet ist die Bedeutung des Trigonellins, dessen Geschichte kurz besprochen wird. Das von verschiedenen Seiten noch in neuester Zeit isolierte "Kaffearin" ist identisch mit Trigonellin. Die Moeglichkeiten zur praeparativen Darstellung und zur analytischen Erfassung des Trigonellins werden besprochen.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Jahns, E.* — Ber.Dtsch.Chem.Ges. **18**:2521.1885.
2. *Hantzsch, A.* — Ber.Dtsch.Chem.Ges. **19**:31.1886.
3. *Jahns, E.* — Ber.Dtsch.Chem.Ges. **20**:2840.1887.
4. *Palladino, P.* — Atti R. Acad dei Lincei Roma **3(1)**:399.1894.
5. *Hilger, A. & Juckenack, A.* — Forschungsberichte ueber Lebensmittel **4**:145.1897.
6. *Graf, E.* — Zschr. oeffentl. Chemie **10**:279.1904.
7. *Polstorff, K. & Goerte, O.* — Wallach-Festschrift **5**:569.1904.
8. *Gorter, K.* — Annal.d.Chem.u.Pharm. **372**:237.1910.
9. *Heiduschka, A. & Bruechner, K.* — Journ.prakt.Chem. **130**:11.1931.
10. *Nottbohm, F. & Mayer, F.* — Zschr. f. Unters. d. Lebensmittel **61**:202.1931 *et* **63**:47.1932.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em maio de de 1937. Dado á publicidade em outubro de 1937).




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA CHIMICO

3. Uso do café no preparo de sabão ou oleo comestivel

POR

C. H. SLOTTA & G. SZYSZKA

Desde outubro de 1936 nossas experiencias preliminares nos vêm mostrando que não existe difficuldade alguma no aproveitamento rendoso e racional dos cafés resultantes da super-producção.

Ultimamente foram embarcadas para Europa 3000 saccas de café, destinadas a pesquisas industriaes. Tanto na Alemanha, como na America do Norte, tomou-se muito a peito esse problema, empregando-se os processos mais modernos.

O mais natural seria que S. Paulo mesmo tomasse a iniciativa de extrahir industrialmente as substancias aproveitaveis do café. O café já extrahido poderia ser empregado para a geração de vapor e com esse vapor se poderiam movimentar os moinhos e os apparelhos de destillação e evaporação na fabrica, de modo que uma empresa dessas theoricamente só gastaria café. Naturalmente ter-se-ia que contar com uma perda constante de dissolventes, a qual, porém, em installações modernas e com uma producção correspondente poderia ser relativamente insignificante. Em breve já não se poderá queimar mais o café em campos abertos proximos das cidades mais populosas, já que a população se oppõe mais e mais ao incommodo proveniente do mau cheiro e da fumaça, e os hygienistas, com toda razão, levantam protestos contra essa medida. O antigo e primitivo systema de eliminação tem que ser abolido e novas medidas introduzidas.

Não é porém, indifferente que se edifiquem e se ensaiem *installações para destruir o café* ou *para utilizar o café*. Naturalmente, destruir é sempre mais simples do que construir, mas a criação de uma nova industria sobre a base da super-producção do café é mais simples do que a principio parece. No mo-

mento presente, temos em São Paulo á nossa disposição tudo aquillo que necessitamos para esse fim, a saber:

1) *Materia prima*, que existe em quantidade quasi inacreditavel. Si 300.000 toneladas de café têm que ser annualmente destruidas, em cada dia util do anno podem ser utilizadas 1000 toneladas.

2) *Machinas*, que são facilmente adquiriveis em São Paulo; extractores pequenos e installações de evaporação para a nossa Secção de Chimica já foram construidas nesta cidade e, com a devida orientação na respectiva construcção das machinas, a industria nacional poderia igualmente construir apparelhos em grandes dimensões. Caldeiras a vapor com combustão especial já estão expostas á venda.

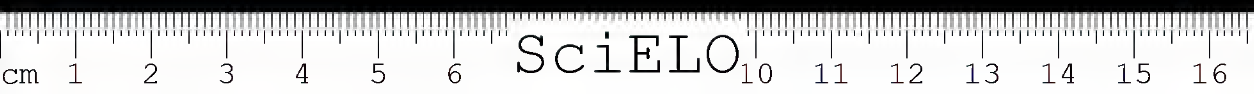
3) *Experiencias preparatorias*, que já estão bem adiantadas. A tentativa da construcção de uma usina para extracção já não correrá mais o risco de fracasso.

O ponto principal no momento já não é a parte puramente chimica e technica do problema, mas sim a parte economica. Suggestões não têm faltado sobre quaes dos productos do café merecem ser explorados: quiz-se do café produzir alcool methylico e ethylico, licor, acido acetico, acetona, ammoniaco, carvão vegetal e muitos outros productos (1). Até agora, porém, não se pôs em practica nenhuma das propostas.

Segundo nossas experiencias, por emquanto só o que compensa é a exploração do oleo, da cafeina e provavelmente do acido chlorogenico, sem falar no *residuo* de cellulosa que, de qualquer modo, é tambem destruida na queima do café.

Sobre o problema da producção adequada do acido chlorogenico do café dissertaremos em proximo trabalho. Technicamente ella não é facil, de sorte que o problema do aproveitamento economico do acido chlorogenico só poderá ser solucionado satisfactoriamente após grande e cuidadoso trabalho chimico.

Quanto á extracção da cafeina aqui no Brasil, já não existe mais difficuldade, mesmo que fosse necessario preparar hydrocarburetos chlorados numa installação áparte. Com isso se augmentaria o campo de applicação para o chloro, resultante em grande quantidade da electrolyse de chloreto de sodio (como hoje em dia já se faz em Nictheroy), e que até agora só poude ser collocado em pequenas quantidades e que é de difficil eliminação. O uso economico da cafeina, mesmo no caso em que grandes quantidades fossem postas no mercado, não offereceria grandes difficuldades. No mercado mundial o valor *industrial* da cafeina ainda oscilla no minimo entre 30$000 a 50$000 o kilo e a necessidade de cafeina justamente por parte da população brasileira ficaria co-



berta com o estabelecimento de uma industria propria, podendo o país passar logo a ser o maior exportador desse sub-producto. Todavia, a extracção exclusiva de cafeina não traria tanta vantagem economica.

A exploração do café só seria de valor economico, si delle se extrahisse tambem o oleo e este fosse beneficiado. A quantidade de oleo contido no grão de café oscilla bastante: segundo varios auctores, é de 4 a 14%. A porcentagem indicada por auctores norte-americanos a principio nos parecia alta demais (2): ella, porém, se refere a uma mistura de café, constante de 14 % de café de Santos, 50 % de Colombia e 10 % de Venezuela. Esse café crú foi primeiramente seccado e depois extrahido pelo ether de petroleo e pelo ether sulfurico, em cuja operação se obteve 14,71 % de oleo. Na mesma extracção do café torrado obtido com a mistura desses cafés já seccados, poude-se observar uma porcentagem de 16,10 % de oleo.

Para fins comparativos com os nossos resultados é de especial interesse o quadro referente ás constantes do oleo obtido com aquelle café torrado:

Indice de iodo	96,05
Indice de saponificação	172,08
Indice de Reichert-Vollny	0,866
Insaponificaveis	10,2%
Saponificavel	87,0%
Acido linolico	29,5%
Acido oleico	20,9%
Acido palmitico	29,2%
Acido estearico	6,4%

Das sementes crúas postas á venda nesta praça pelo "Café Jardim", completamente seccadas e após extracção com ether, conseguimos obter 14,7 % de oleo, o qual ainda continha 0,2% da cafeina do café. O mesmo café torrado e seccado dá 17,9% de oleo, o que está em perfeito accordo com a porcentagem obtida com a mistura de café dos norte-americanos. Após multiplas outras extracções experimentaes, feitas especialmente com dois typos de café postos á nossa disposição pelo Instituto de Café, observámos, no entanto, que esse alto teor em oleo constituia uma excepção: o café nacional crú, já seccado, em geral accusava uma porcentagem de 7,2 a 8,5 % de oleo, de modo que estamos inclinados a opinar conservadoramente que o café que nos pode interessar contém, depois de completamente seccado, em media 8 % de oleo. Do modo como é fornecido ao Instituto de Café, isto é, seccado ao ar, elle contém ainda approximadamente 10-12 % de agua, de sorte que, á luz de nossas experiencias, podemos apenas attribuir 7 % de oleo ao café crú em geral.

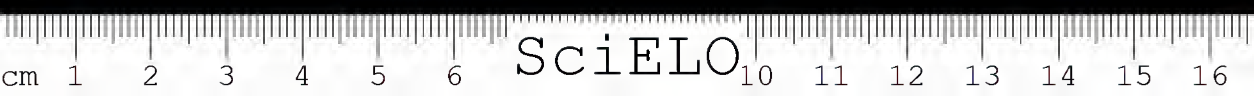
Para uma fabricação é de grande valor que a extracção de oleo e cafeina possa ser feita com um café ainda não seccado. A difficuldade consiste especialmente em encontrar machinas apropriadas para trituração, as quaes desintegrem o café seccado ao ar, até o ponto de facultar uma completa extracção. Para experiencias em laboratorio este ponto não apresenta um problema difficil, mas para a exploração industrial ainda ha impecilhos a eliminar.

Até agora extrahimos o café com ether sulfurico ou com uma certa fracção de gasolina. A extracção pelo ether tem a vantagem de que este producto é fabricado em grande escala aqui no Brasil e tem o poder de extrahir completamente o oleo. Sua desvantagem consiste, porém, em que approximadamente a quinta parte da cafeina contida no café passa, já na extracção com ether, para a fracção de oleo. Uma vez que se tenciona aproveitar o oleo para fazer sabão commum, não se dando valor exclusivo á obtenção da cafeina, este facto não influe. Tencionando-se, porém, aproveitar alguma vez o oleo como comestivel e ao mesmo tempo obter a cafeina na sua integra, é preferivel a extracção com gasolina.

A extracção com gasolina fornece um oleo que é bem mais claro e que contem pouca cafeina. Ainda não tivemos opportunidade de fazer experiencias com sulfureto de carbono produzido em S. Paulo, mas provovelmente seriam de interesse. A escolha do dissolvente depende, por certas razões, de que ainda falaremos, até certo ponto das propriedades thermicas dos referidos liquidos. O calor de vaporização do ether de petroleo (79 cal.), do sulfureto de carbono (84 cal.) e do ether sulfurico (85 cal.) por g. não é tão differente, que mereça que se lhe dispense muita attenção nas primeiras experiencias.

Para as nossas extracções no laboratorio empregamos extractores de vidro typo Soxhlet e, para quantidades de 8 ks. de café crú moido, construimos um extractor moderno que trabalha pelo principio de contra-corrente. No recipiente interno o café está em peneiras sobrepostas. Entre o exterior do recipiente e a parede interna do envolucro sobem os vapores do respectivo dissolvente e condensam-se no refrigerador collocado na tampa do extractor, de modo que de lá constantemente cahe dissolvente, que atravessa a massa de café solubilizando o oleo e passando novamente ao balão aquecido.

Naturalmente, após a extracção, a massa do café conserva uma elevada quantidade de dissolvente, que em escala pequena só pode ser difficilmente retirada. Numa escala industrial deveria ser facil a sua expulsão por meio de temperaturas mais elevadas, permittindo assim uma recuperação quasi que completa. No mesmo extractor pode-se proseguir, após a extracção do oleo, com a da cafeina. Nas experiencias *in vitro* sempre trabalhamos com chloroformio. Para experiencias em grande escala seria preferivel empregar outros hydrocarburetos chlorados, com os quaes se pode retirar bastante rapida e mais facilmente



o 1% de cafeina contido no café brasileiro, de accordo com as nossas experiencias. Tambem nesse caso torna-se necessaria uma installação de recuperação do dissolvente antes que o material, que consiste essencialmente em cellulosa, possa ser queimado Segundo nossas experiencias seriam necessarios, para extrahir uma tonelada de café em 24 horas e usando-se vapor para o aquecimento do dissolvente, no minimo 2.200 kilos de vapor. Com uma construcção apropriada dos extractores e evaporadores, como tambem por meio de outras providencias de ordem chimico-technica deveria ser possivel economizar-se no minimo 25 % desta quantidade de calor. Neste caso o residuo da extracção seria sufficiente como combustivel, pois, segundo estimativas cuidadosas, de uma tonelada de café se obtém 800 kilos de residuo com os quaes é possivel produzir-se 1.760 kilos de vapor numa caldeira moderna. O essencial é que a fabricação seja dirigida de tal modo, que a fabrica se abasteça economicamente, utilizando como calor exclusivamente o resultante da combustão dos residuos de café.

Um outro problema economico em vias de solução é o de aproveitamento do oleo para o fabrico de sabão commum ou para consumo como alimento. Segundo nossas estimativas, de uma tonelada de café obtêm-se 70 kilos de oleo, que, por sua vez, fornecem 140 kilos de sabão, ou então 7 kilos de glycerina. O sabão que preparamos é, sem qualquer refino, optimo para lavanderias. As experiencias que visam aproveitar o oleo para fins comestiveis ainda não estão concluidas, parecendo que para esse fim é necessario retirar-se os insaponificaveis.

Pelos motivos acima expostos a pesquisa do oleo extrahido do café, visando seu aproveitamento, é de importancia para a installação de uma fabrica. O problema chimico que estamos agora atacando com o auxilio da Secção de Physiologia e Pharmacologia visa o estudo do oleo no café em todos os sentidos, tanto analytica, como physiologicamente.

A questão do aproveitamento industrial do café não deve ser considerada sómente sob o ponto de vista technico; ella exige profundas reflexões de natureza economica.

RESUMO

Experiencias feitas sobre a chimica do oleo do café extrahido do café brasileiro accusaram, primeiramente, grandes divergencias na porcentagem do oleo contido nos cafés: desde 14,7 %, no café crú, até 17,9 %, no café torrado e secco. Em geral o café crú contém, além dos 10-12 % de agua, apenas 7-8 % de oleo. Ensaios de caracter economico industrial demonstraram que os residuos do café deveriam ser sufficientes como material de combustão para a extracção do café e que o oleo do café, depois de competente purificação e preparo poderia ser empregado para diversos fins.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen ueber die Chemie des Kaffee-Oels aus brasilianischem Kaffee ergaben zunaechst einmal grosse Unterschiede im Prozentgehalt der Kaffees an Oel. Es wurden bis 14.7% im Rohkaffee und bis 17,9% im geroesteten und getrockneten Kaffee gefunden. Fuer gewoehnlich enthaelt der Rohkaffee aber neben 10-12 % Wasser nur 7-8 % Oel. Ueberlegungen technisch-wirtschaftlicher Art ergaben, dass die Kaffee-Rueckstaende als Feuerungsmaterial fuer die Kaffee-Extraktion ausreichen duerften und dass das Kaffee-Oel nach entsprechender Reinigung bzw. Aufarbeitung fuer verschiedene Zwecke verwandt werden kann.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Fontoura, C. & Andrade, P. B. de* — Boletim da Associação Brasileira de Farmaceuticos I, Janeiro 1932.
2. *Bengis, R. O. & Anderson, R. J.* — J.Biol.Chem. 105:138.1934.
Bengis, R. O. — Industrial & Engineering Chemistry 28:290.1936.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).



612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA CHIMICO

4. Determinação e extracção do acido chlorogenico do café

POR

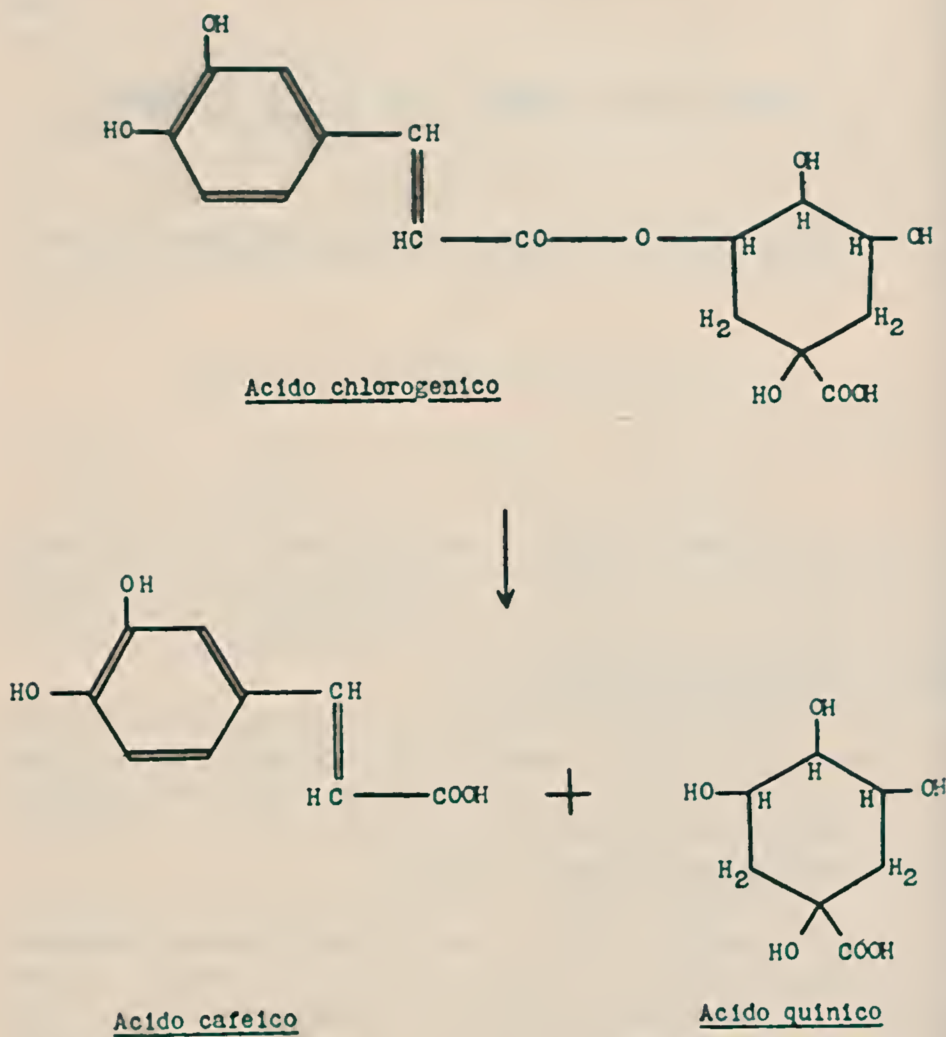
C. H. SLOTTA; C. NEISSER & A. CARDEAL

Ha já muito tempo é notorio que o café contem um acido tannico, chamado acido chlorogenico, cuja constituição e configuração hoje em dia nos é perfeitamente conhecida. Pode-se considerar o acido chlorogenico como o ester do acido cafeico com o acido quinico, acidos que resultam do desdobramento do primeiro por agentes saponificantes.

Sabido é igualmente que o café contém alta porcentagem de acido chlorogenico. Mas a "determinação quantitativa desse acido ainda não foi conseguida de modo satisfactorio" (1). Não ha duvida que existem muitos processos para essa determinação, mas após verificação exacta foram todos reconhecidos como imprestaveis, ou de emprego limitado (2).

O teor em acido chlorogenico do café não é sómente de interesse sob o ponto de vista scientifico. Tendo este acido um sabor fortemente adstringente, é de suppôr que um teor mais ou menos elevado de acido chlorogenico poderá influenciar consideravelmente o sabor do café. Justamente para a maioria dos cafés brasileiros, cujo sabor duro é tantas vezes recriminado, o conhecimento exacto do conteúdo de acido chlorogenico é de summa importancia. Sómente conhecendo-o será possivel reduzir o teor em acido chlorogenico, mediante experiencias de selecção ou adubamento, sob constante controlo analytico. Além disso, até ha pouco se desconheciam os effeitos physiologicos do acido chlorogenico, especialmente em combinação com as substancias, com que apparece no café. Experiencias interessantes nesse sentido estão sendo executadas na secção de Physiologia e Pharmacologia deste Instituto. Para a apreciação scientifica

da tolerancia de um café, o conhecimento do teor do acido chlorogenico será de grande importancia. Finalmente, o conhecimento exacto do conteúdo de acido chlorogenico será imprescindivel para o provavel aproveitamento industrial.



Por todos estes motivos nos dedicamos, ha já um anno, á verificação de antigos methodos e á elaboração de novos para a determinação do acido chlorogenico. Antecipamos que até hoje ainda não conseguimos elaborar um methodo definitivo, realmente satisfactorio; no entanto já temos idéas mais claras sobre muitos pontos e pensamos estar pisando em terreno firme, motivo pela qual temos o ensejo de transmittir um pequeno extracto das innumeras observações feitas durante o anno.

Decisivas para a orientação de nossas pesquisas foram as exigencias por nos impostas ao methodo. Já que este deve ser adaptavel a analyses em serie, é mister que seja 1) rapido, 2) ao alcance de auxiliares pouco competentes e 3) capaz de ser executado com o apparelhamento commum de laboratorio. De outro lado, podemos renunciar a uma exactidão absoluta e nos contentaremos com um limite de erro de uns 5 %. Considerando os methodos existentes sob estes pontos de vista, quasi todos são de antemão eliminados; pois, ou elles exigem uma grande habilidade experimental, ou requerem para a sua determinação mais ou menos uma semana.

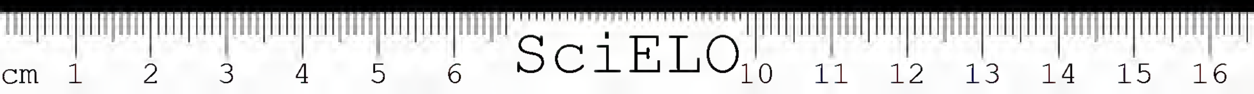
Em todo caso estes methodos indicaram o rumo a tomar em nossas pesquisas. Em regra, podemos differenciar tres grupos de methodos: no primeiro, se determina o acido chlorogenico em si, por via gravimetrica, polarimetrica ou por titulação; no segundo, se lança mão de uma reacção de côr do acido chlorogenico (com acido nitroso) e aproveita-se da intensidade da coloração resultante, colorimetricamente; no terceiro, finalmente, se scinde o acido chlorogenico em acido cafeico e acido quinico, determinando-se então, de qualquer modo, um desses acidos (o acido cafeico). O acido cafeico, ao contrario do acido chlorogenico e quinico, é soluvel em ether, podendo assim ser extrahido de outras substancias complexas. A difficuldade consistia nos obstaculos existentes na preparação de solutos bastante puros do acido chlorogenico do café, o que seria imprescindivel para a determinação.

Divergem bastante as opiniões sobre os agentes de extracção mais apropriados. Temos que tomar em consideração que o café contém o acido chlorogenico em parte livre, difficilmente soluvel em agua e facilmente em alcool, e em parte como o sal de potassio, facilmente soluvel em agua e quasi insoluvel em alcool; ainda uma terceira parte delle se apresenta como um sal complexo de potassio com cafeina, o qual é tambem facilmente soluvel em agua e difficilmente em alcool. Em virtude dessas peculiares solubilidades, a agua pura e o alcool puro (do mesmo modo o methanol, acetona, ether acetico, etc.) ficam eliminados como agentes extractivos. Porisso, pensou-se em usar misturas de dissolventes, como alcool a 80%. Fizemos muitissimas experiencias para resolver este problema, e chegamos á conclusão de que a acetona a 30% representa um optimo dissolvente. Methanol a 50% é igualmente apropriado, porém extrahe mais elementos secundarios indesejaveis; o mesmo acontece com o alcool diluido. Com acetona a 30% conseguimos, em duas horas, extrahir todo o acido chlorogenico de uma amostra de 10 gs. de café crú (quantidade sempre por nós empregada), uma vez que se renove o dissolvente depois da primeira hora. A completa extracção foi todas as vezes verificada pelo resultado negativo da reacção de Hoepfner (3).

Os auctores, em sua quasi totalidade, empregam, para chegar a solutos de acido chlorogenico do café, precipitados de seu sal de chumbo, o qual em seguida é decomposto pelo hydrogenio sulfurado. E' sabido que o acido chlorogenico é precipitado completamente pelo acetato de chumbo; no entanto, ainda não estava resolvida a questão de si o acetato de chumbo não precipita tambem outras substancias, especialmente outros acidos, e si as mesmas não são igualmente levadas até ao soluto final. E, finalmente, surgiu ainda a duvida de si no precipitado de chlorogenato de chumbo, bastante volumoso, não se acham adsorvidos outros saes de chumbo, em si soluveis e que, desse modo, perturbem o desenvolvimento da determinação. Todos estes problemas pudemos solucionar categoricamente, baseados em nossas experiencias. A suspeita de que saes de chumbo soluveis sejam arrastados mechanicamente, na precipitação de chlorogenato de chumbo, foi comprovada; do mesmo modo, saes de chumbo insoluveis em agua foram igualmente precipitados. No soluto isento do chumbo pela precipitação com hydrogenio sulfurado, encontramos, além do acido chlorogenico, tambem outros acidos, entre os quaes pudemos até hoje identificar o acido acetico e o acido cafeico, formando o primeiro um sal de chumbo soluvel em agua, e o segundo, um insoluvel em agua. Não é, pois, de admirar que, p. ex., o methodo de Jurany (4) nos dê resultados inexactos, visto que o mesmo trabalha com solutos ainda não libertados desses acidos. Por mais que se lavem com agua, não se conseguem afastar os saes de chumbo desses acidos, em si soluveis, do precipitado de chlorogenato de chumbo. Deixámol-os, portanto, dentro do precipitado, pusemos em liberdade, pelo hydrogenio sulfurado, os acidos livres juntamente com o acido chlorogenico e tratámos com ether o soluto assim obtido durante varias horas no extractor automatico. Experiencias comparativas demonstraram que uma extracção rapida e intensa com ether, durante quatro horas, consegue afastar esses acidos quantitativamente.

Em algumas experiencias em escala maior conseguimos, como já mencionámos, identificar o acido cafeico e o acido acetico nesse extracto de ether. Enquanto que o primeiro fôra obtido em estado crystallino, o ultimo poude ser claramente reconhecido pelo seu cheiro.

Com isto foi afastada uma fonte de graves erros dos antigos methodos. Os methodos de precipitação do chumbo ainda encerram varios erros. A decomposição do precipitado de chumbo procede-se rapida e completamente na suspensão em agua ou agua-alcool, o sulfureto de chumbo se deposita claramente e deixa-se filtrar com facilidade. Parece que até hoje se tem dado pouca attenção á lavagem do precipitado de sulfureto de chumbo. Este sal retém rebeldemente o acido chlorogenico por adsorpção, de modo que muitas vezes, ainda depois da decima lavagem com agua quente, obtinhamos uma reacção de



Hoepfner positiva para o sulfureto de chumbo. Para evitar estas lavagens tão morosas, lançámos mão de um artificio para as experiencias posteriores. Procedemos á decomposição de sulfureto de chumbo num balão volumetrico de vidro Jena, deixando-o esfriar após a passagem de uma corrente de hydrogenio sulfurado e completando o volume até a marca. Agitámos convenientemente, filtramol-o num filtro secco e do filtrado empregámos uma parte aliquota (em geral a metade) para a determinação subsequente, após termos expulsado todo o hydrogenio sulfurado do soluto por areação. Em experiencias de controle verificámos que, com o emprego desse systema simplificado, não ha perda alguma: obtém-se a mesma quantidade de acido chlorogenico, quando se emprega o methodo indicado, ou quando se lava o sulfureto de chumbo até desapparecer a reacção de Hoepfner.

Desse modo chega-se a um soluto claro, de côr ligeiramente amarella, do qual se extrahem com ether os acidos acima citados. E' sómente necessario expellir o ether da camada aquosa, quer por ventilação, quer por aquecimento, para poder-se proceder a sua determinação.

A determinação do acido chlorogenico neste soluto, no entanto, não é das mais simples. Já antigos auctores declaravam que a determinação do residuo por evaporação fornece valores duvidosos.

Mais tarde lançou-se mão de methodos titrimetricos, os quaes foram igualmente insufficientes, ainda que a titulação fosse executada electrometricamente.

Jurany (4), finalmente, emprega a rotação do plano da luz polarizada, para assim poder deduzir o teor em acido chlorogenico do soluto. A pequena rotação especifica do acido chlorogenico torna impossivel neste caso a determinação exacta.

Já que, para experiencias em serie, a titulação tem dado sempre os melhores resultados, orientámos os nossos ensaios neste sentido. Em analyses preliminares determinámos primeiramente as concentrações e os indicadores mais apropriados. Depois de alguma pesquisa, verificámos que o acido chlorogenico se deixa titular admiravelmente em solutos aquosos diluidos mediante um soluto de 0,1 N de hydroxido de sodio, empregando-se o vermelho neutro como indicador. Em tres exemplos encontrámos, em vez de 100% de acido chlorogenico, 100,50%; 99,80% e 99,30%.

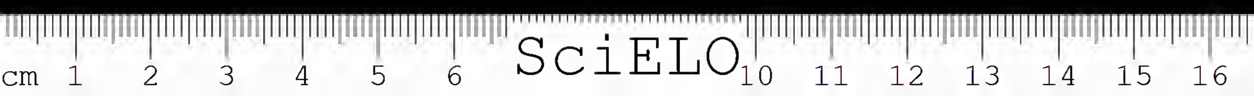
O grau de exactidão é mais do que sufficiente, a viragem de vermelho violaceo a vermelho alaranjado, bastante forte, permitte titular com uma exactidão de duas gottas. O emprego de solutos mais diluidos pouco augmenta a exactidão. Infelizmente, tivemos que verificar que a viragem nos solutos de acido chlorogenico obtidos do café não é mais tão nitida. Isso, juntamente com outras observações, indica que, mesmo em nosso soluto final altamente purificado,

ainda existem outras substancias. A possibilidade de que estes corpos sejam acidos não pode ser posta completamente de lado: nesse caso simulariam um teor de acido chlorogenico elevado. A separação dessas substancias do acido chlorogenico seria muito difficil, si se tratasse realmente de acidos, pois as propriedades de precipitação e solubilidade não apresentam differenças perceptiveis.

Parece existir sómente um meio para esclarecermos a natureza dessas impurezas: a titulação potenciometrica do soluto. Por meio de um potenciometro poderemos decidir categoricamente si se trata de acidos, materias neutras ou bases: esse apparelho permitte abranger ao mesmo tempo varios acidos, mesmo quando as suas constantes de dissociação apenas differem por pouco umas das outras. O emprego do potenciometro certamente ainda prestará outros serviços: para retirar os acidos soluveis em ether não será mais necessaria uma extracção de 4 horas, pois que doravante se titularão os ditos acidos no mesmo soluto conjunctamente com o acido chlorogenico. Mais tarde trataremos da titulação potenciometrica, uma vez que a pudermos executar. Para esse fim careciamos até agora do apparelhamento necessario, que já está sendo adquirido.

Antes de nos dedicarmos á titulação do acido chlorogenico pensavamos ver um caminho seguro, saponificando o acido chlorogenico com um soluto alcalino, acidulando o soluto, separando com ether o acido cafeico resultante, e doseando-o por titulação. Para esse fim verificámos que, na titulação do acido cafeico, o chloreto ferrico se presta admiravelmente como indicador. Tendo, porém, mais tarde passado para as experiencias de desdobramento do acido chlorogenico puro, obtivemos sempre resultados divergentes. Uma metachromasia dos solutos alcalinizados indicava que se dava qualquer decomposição. Podiamos evitar esta metachromasia, trabalhando sob exclusão de ar, p. ex., sob uma camada de um dissolvente indifferente (ether livre de peroxydos). Assim mesmo não nos foi possivel obter resultados satisfactorios. Finalmente verificámos que o acido cafeico puro não resiste a um tratamento alcalino e subsequentemente acido: deixámos repousar acido cafeico puro com alcali sob dissolventes indifferentes, acidulando-o depois do prazo habitual com acido sulfurico e extrahindo-o a seguir com ether. No soluto etherico encontrámos, em vez de 100% de acido, 117,10%. Dá-se certamente um desdobramento parcial do acido cafeico com formação de dois ou mais acidos novos. Abandonámos, pois, esta orientação, visto que todos os methodos que a seguem, perdem o valor analytico.

No decurso de nossas experiencias (que por enquanto só se referem ao café crú) encontrámos que, nos extractos com alcool aquoso e acetona aquosa do café uma parte do acido chlorogenico se deixa titular directamente, tomando-se o vermelho neutro como indicador. O acido chlorogenico assim obtido representa aquella parte existente em estado livre no café, i. é., nem como sal de potassio nem como sal duplo de potassio e cafeina. Este *acido chlorogenico livre* é o



primeiro valor que determinamos no decurso de nossa analyse. Mais tarde, depois da precipitação do chumbo e das operações subsequentes, obtemos a quantidade de *acido chlorogenico total.* Da differença desses teores resulta a quantidade de *acido chlorogenico combinado* no café. Como, pois, o chlorogenato de potassio forma um composto completo com cafeina em proporções moleculares, pode-se calcular, guiando-se pelo teor de cafeina já obtido por outro processo, quanto *acido chlorogenico existe em forma de chlorogenato de potassio e cafeina.* Conhecendo-se esse teor e mais o teor do acido chlorogenico combinado, deduz-se da differença dessas duas substancias o *acido chlorogenico contido em forma de sal de potassio.* No curso de nossas experiencias esperamos obter dados sobre o acido chlorogenico em suas 5 formas, os quaes em sua grandeza absoluta e suas relações entre si certamente poderão solucionar varias questões relativas ao sabor e aos effeitos physiologicos, uma vez que tenhamos examinado minuciosamente um grande numero de cafés. Além disso, incluimos em nossos exames aquelles *acidos ligados* (elles são encontrados em forma de sal) que são extrahidos do soluto final pelo ether.

Sendo a nossa determinação de acido chlorogenico, feita no decurso de uma analyse, na qual com uma amostra de 10 gs. de café são determinados primeiramente a humidade, depois a porcentagem de gordura, o conteúdo de cafeina, os diversos teores de acido chlorogenico, e dos acidos ligados, e finalmente a trigonellina, pensamos que, dentro de pouco tempo, poderemos atacar com exito taes problemas, ainda mal explorados, que dizem respeito ás causas chimicas do sabor do café.

* * *

Innumeros problemas surgiram quando começámos com a apresentação preparatoria do acido chlorogenico do café. Para as experiencias analyticas descriptas na primeira parte deste trabalho, assim como para os exames physiologicos, necessitavamos de grandes quantidades de acido chlorogenico purissimo. Como, para esse fim, nos interessassemos pela extracção industrial do acido chlorogenico em grande escala, executámos desde o principio as nossas experiencias em proporções semi-industriaes, i. é., com varios kilos de café. O unico methodo de preparação até agora existente para o acido chlorogenico do café (5) é, de modo algum, satisfactorio. Elle se utiliza do poder de crystallização do chlorogenato de potassio mais cafeina e despreza propositalmente a parte do acido chlorogenico em estado livre ou em forma de sal de potassio. Um pequeno calculo approximado mostra com que grandes perdas voluntarias tem-se que contar nesse caso: no café brasileiro existe uma media de 1% de cafeina. Esta quantidade tem o poder de ligar 1,92 % de acido chlorogenico sob a forma de sal duplo de potassio. Temos, porém, que contar com um teor medio de

6% de acido chlorogenico, de modo que se perdem 2/3 da quantidade total. Na pratica, porém, o rendimento ainda é bem peor: em vez de 3% de chlorogenato de potassio mais cafeina obtem-se apenas 1%, de modo que realmente só se consegue extrahir 1/10 do acido chlorogenico theoricamente calculado.

Para a extracção do café — em antithese á extracção analytica — outros pontos de vista são decisivos. Sendo technicamente quasi impossivel extrahir uma massa tão volumosa como é o café crú á temperatura de ebullição do dissolvente, teve-se que encontrar um dissolvente com o poder de extrahir completamente do café o acido chlorogenico a uma temperatura moderada. Sómente assim seria possivel operar em vasilhames abertos, remexendo o material, o que apresenta o trabalho mais rendoso numa operação em grande escala. O methodo de apresentação acima mencionado (5) extrahe o café com agua fria, a qual praticamente só dissolve o sal de potassio do acido chlorogenico e seu complexo com cafeina. Uma extracção bem mais completa conseguimos com alcool a 80% ou 70% numa temperatura de 60°. O methanol tambem deu bons resultados em pequena escala; e ensaios com acetona diluida, dissolvente, segundo nossas experiencias, bem adequado para as extracções analyticas, estão sendo elaborados.

No decurso da elaboração concentrou-se fortemente o extracto por evaporação no vacuo, e precipitou-se então em fracções com alcool, processo esse muito demorado e que exige grande habilidade experimental. Neste ponto de preparação pudemos encontrar um aperfeiçoamento muito notavel do antigo methodo, adoptando a precipitação por meio de methanol. Do soluto aquoso castanho-escuro, obtinham-se antigamente, precipitando com alcool, primeiramente grande quantidade de graxas, que eram desprezadas, e mais tarde, depois de repousar varios dias na geladeira, o chlorogenato de potassio mais cafeina em forma de crystaes. Precipitando-se com methanol, obtém-se um soluto claro castanho-avermelhado, no qual se inicia quasi que instantaneamente a separação dos crystaes, a qual está completa após 24 horas na geladeira. Deste modo conseguimos elevar a producção do antigo methodo de 50%, de modo que hoje em dia obtém-se pelo menos a metade da quantidade theoricamente calculada de chlorogenato de potassio mais cafeina contida no café.

O chlorogenato de potassio mais cafeina é, então, facilmente obtido num bom grau de pureza pela recrystallização em alcool aquoso ou methanol aquoso ou puro. Dos solutos aquosos desse sal extrahe-se com chloroformio, quantitativamente, a cafeina, ficando em solução o chlorogenato de potassio. Desse soluto obtém-se então por acidulação o acido chlorogenico, porém nunca em rendimento superior a 60%. A crystallização do acido chlorogenico, assim como sua purificação subsequente, exige muita paciencia, visto que elle possue pouca tendencia para a crystallização.

Como podemos ver, a preparação do acido chlorogenico por esse methodo, apesar de todos os aperfeiçoamentos, é ainda bem pouco satisfactorio. A extracção por meio de acetato de chumbo, como a empregamos na analyse, tem technicamente o inconveniente de que, de um lado, é muito cara e, de outro, implica no uso de grandes volumes de precipitados e filtrados. A crystallização directa do acido chlorogenico pouco promette em vista do acima exposto.

Por enquanto estamos certos de que o unico methodo industrialmente aproveitavel é aquelle em que se passa toda a quantidade do acido chlorogenico do café para o sal complexo de potassio com cafeina, addicionando ao extracto qualquer sal de potassio barato, mais a quantidade calculada de cafeina. Recuperando-se a cafeina quantitativamente, como pudemos ver no decurso de nosso trabalho, ella pode entrar sempre de novo no processo da elaboração, sendo as perdas insignificantes. Esperamos poder aperfeiçoar a apresentação do sal complexo de potassio a tal ponto, que se possa empregar na practica para a extracção quantitativa. Si conseguirmos realizar essa nossa esperança, teremos solucionado o problema da extracção de qualquer quantidade de acido chlorogenico do café.

RESUMO

Descreve-se a importancia do problema da determinação do acido chlorogenico no café. Tendo-se os methodos até agora existentes mostrado insufficientes para a sua determinação, realizaram-se innumeros ensaios, com o fim de se descobrir um novo processo que fosse applicavel ás analyses em serie. As difficuldades para a obtenção de solutos finaes, contendo todo o acido chlorogenico, foram encaradas em varias experiencias e, depois, vencidas. Executou-se a determinação do acido chlorogenico nos solutos finaes, mediante emprego de titulação alcalina, e descreveram-se, tanto as fontes de erros, como os meios de serem estes afastados.

Em seguida relatam-se os progressos feitos no preparo do acido chlorogenico, mostrando-se a respeito as diversas difficuldades theoricas e practicas a serem vencidas. Mediante um novo methodo de preparo consegue-se augmentar o rendimento de acido chlorogenico em 50%, embora, neste ponto, ainda se devam fazer novas experiencias para se ficar verdadeiramente satisfeito com os resultados obtidos.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Wichtigkeit des Problems der Bestimmung der Chlorogensaeure im Kaffee wird besprochen. Da die bisherigen Methoden zu ihrer Bestimmung

unbefriedigend sind, werden zahlreiche Versuche unternommen, eine neue Methode zu finden, die fuer Serienanalysen geeignet ist. Die Schwierigkeiten reine Endloesungen zu erhalten, die die Chlorogensaeure vollstaendig enthalten werden durch Versuche belegt und schliesslich ueberwunden. Die Bestimmung der Chlorogensaeure in diesen Endloesungen durch Alkali-Titration wird durchgefuehrt, und die auch dieser Methode anhaftenden Fehlerquellen, sowie die Moeglichkeiten zu ihrer Beseitigung werden besprochen.

Im zweiten Teile der Arbeit wird ueber Fortschritte berichtet, die bei der praeparativen Darstellung der Chlorogensaeure gemacht worden sind. Sowohl die theoretischen, wie die praktischen Schwierigkeiten, die dabei zu ueberwinden sind, werden behandelt. Mit Hilfe der neuen Methode gelingt es, die bisher erhaltene Ausbeute um 50% zu verbessern. Jedoch auch diese Methode bedarf noch weiterer Versuche, um wirklich befriedigende Ergebnisse zu liefern.

BIBLIOGRAPHIA

1. Handbuch der Lebensmittelchemie 6:41.1934.
2. a) Handbuch der Lebensmittelchemie 6:41.1934
   b) *Hoepfner, W.* — Ztschr.Unters.Lebensm. 66:238.1933.
   c) *Griebel, C.* — Ztschr.Unters.Lebensm. 67:452.1934.
   d) *Plücker, W. & Keilholz, W.* — Ztschr.Unters.Lebensm. 68:97.1934.
   e) *Tiedcke, C.* — Ztschr.Unters.Lebensm 71:217.1936.
   f) *Tiedcke, C.* — *loc. cit.* 71:385.1936.
3. *Hoefner, W.* — Chem.Ztg. 56:991.1932.
4. *Jurany, H.* — Ztschr.anal.Chemie 94:15.1933.
5. *Freudenberg, K.* — Ber.dtsch.chem.Ges. 53:237.1920.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937)

612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA CHIMICO

5. Tres novas substancias do café

POR

C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Introducção

Ao darmos inicio aos nossos trabalhos sobre o oleo do café, dedicámos desde logo uma especial attenção aos insaponificaveis por acaso nelle contidos. O insaponificavel de qualquer producto gorduroso encontrou nos ultimos tempos um interesse todo especial, visto que nelle existem substancias muito interessantes e de alto valor, como sejam as vitaminas A e D, principios de effeito estrogenico e outras.

Por isso, muito nos admiramos que, até o presente, quasi nada se tenha feito a proposito da substancia insaponificavel do café. Pode-se dizer que os poucos estudos existentes são da auctoria de Bengis e Anderson (1), dois pesquisadores norte-americanos, que se dedicaram apenas de passagem a esta questão, concentrando mais tarde sua attenção sobre os problemas relacionados com a rancificação da gordura.

Por suas experiencias, todavia, nos certificamos que as gorduras do café são relativamente ricas em insaponificaveis. Bengis e outros auctores declaram que as gorduras do café contêm uma media de 10 % de insaponificavel. Em innumeras experiencias pudemos confirmar plenamente esses dados; no entanto, como já foi dito em um outro trabalho desta serie, o teor em gordura oscilla muito nas diversas especies de café e com elle tambem a porcentagem de insaponificavel. Além disso, verificou-se que o insaponificavel das gorduras do café contém uma phytosterina, que é a nosso ver a sitosterina. Finalmente, Bengis insulou uma substancia bem crystallizada, que elle denominou de "Kahweol".

Sua "Kahweol" funde a 142-144° C.; é muito sensivel ao ar; tratada com o acido acetico anhydrico, fornece um mono-acetato e, na hydrogenação catalytica, recebe 3 mol. de hydrogenio. Esse hexahydro-producto contém um novo grupo hydroxyla, cuja origem Bengis explica pela hydrogenação do grupo cetonico da "Kahweol". Por methodo directo não se poude verificar esse grupo cetonico. Bengis propós para o "Kahweol" a formula $C_{19}H_{26}O_3$.

Marcha dos estudos

Nosso fito era primeiramente reproduzir essas experiencias e, si possivel, confirmal-as. Infelizmente já muito breve verificámos que o esclarecimento chimico do insaponificavel do café é bem mais complicado do que Bengis suppunha. De seus resultados pudemos apenas confirmar a existencia da phytosterina, a qual, embora em pequena escala, conseguimos insular do insaponificavel em estado chimicamente puro. Em vista de seu ponto de fusão e rotação optica, suppomos tratar-se de uma γ sitosterina.

Ensaios minuciosos e repetidos levaram-nos á conclusão de que o insaponificavel do café representa uma mistura complicada, da qual pudemos, além da sitosterina, extrahir *tres novas substancias puras em forma crystallina.*

Já possuimos uma *quarta substancia*, porém em quantidade tão diminuta, que por enquanto, ainda não a podemos descrever.

Essas cinco substancias representam apenas a metade do insaponificavel, segundo calculo sobre o seu peso, de sorte que achamos ter fundamento para suppor que ainda existem outras substancias crystallizaveis no insaponificavel.

O residuo não crystallizado apresenta-se sob forma de uma resina vermelho-parda transparente, que ora estamos investigando.

Nenhuma das nossas novas substancias se identifica com a "Kahweol" de Bengis. Nenhuma é sensivel ao ar e seus pontos de fusão são inteiramente differentes. Em vista de nossas innumeras e minuciosas experiencias, achamos muito pouco provavel que a "Kahweol" de Bengis tivesse escapado a nossas vistas; suppomos antes que Bengis tenha tido em mãos uma mistura bastante impura, a qual certamente continha um ou outro dos nossos productos, como tambem a sitosterina. Sómente assim poderiamos explicar os dados numericos da analyse de Bengis, mais ou menos correspondentes á formula $C_{19}H_{26}O_3$.

Enquanto desconhecermos a constituição chimica das novas substancias, não as desejamos denominar, preferindo designal-as provisoriamente como substancias "A", "B" e "C".

Estes tres productos apparecem no insaponificavel em quantidades bem diversas: quanto á quantidade, é de maior valor a substancia "B", a qual em geral pode ser insulada numa porcentagem de 0,28 a 0,30 em relação

ao café); igualmente foi insulada em proporção identica numa experiencia feita com café torrado. A porcentagem da substancia "A" no café é de m. o. m. 0,03, e a da substancia "C", ainda menor; esta ultima até agora só poude ser extrahida de uma quantidade de 24 kgs., e seu conteúdo não é superior a 0,001%.

Ainda que, conforme já dissemos, o teor em gorduras e, portanto, em insaponificavel de um café esteja sujeito a grandes oscillações, parece que a porcentagem em substancia "B" pouco varia: de um café "Jardim" com um teor em gorduras de quasi 15%, pudemos retirar 0,30% da substancia "B"; de um outro café com um teor em gorduras inferior a 8% obtivemos 0,28% da substancia "B", practicamente a mesma quantidade.

Em muitas experiencias reconhecémos, como muito efficaz para a obtenção e separação do insaponificavel um methodo especial, cujos dados são explicados na parte experimental. As gorduras isentas de cafeina são saponificadas á temperatura do ambiente com hydrosoluto de soda sob forte agitação; experiencias comparativas mostraram que a saponificação dura 12 horas. Já que possuiamos sempre grandes quantidades a saponificar para retirar quantidades sufficientes de substancias contidas no café em uma porcentagem tão diminuta, tinhamos que renunciar ao methodo bem mais rapido, si bem que mais caro, de saponificação com potassa alcoolica. Extrahíamos do sabão o insaponificavel com ether, e, após evaporação do dissolvente, obtinhamo-lo em forma de massa clara, que, em sua quasi totalidade, crystallizava na geladeira.

Nos ultimos annos a adsorpção chromatographica deu optimos resultados na separação de misturas complicadas de productos naturaes. Infelizmente, foi baldada nossa esperança de chegarmos á meta com este methodo elegante, em cuja elaboração não se observava perda alguma. Para a obtenção apenas da sitosterina é aconselhavel a adsorpção com oxydo de aluminio. Dissolve-se o insaponificavel em acetona e deixa-se correr sobre uma columna de adsorpção, achando-se então a sitosterina na segunda zona bem mais colorida; dahi pode-se eluir a sitosterina com benzol, juntamente com um oleo castanho-escuro, e, após a evaporação do benzol e recrystallização em alcool, ella surge sob a forma de crystaes branquissimos, enquanto o oleo permanece no soluto alcoolico mãe; depois da segunda recrystallização o ponto de fusão permanece constante.

Technica geral

Uma vez que, justamente, as outras substancias eram as que nos interessavam, elaborámos uma separação por dissolventes, a qual deu optimos resultados em innumeras provas. Trituravamos o insaponificavel com uma carga indifferente, p. ex., sulfato de sodio secco, até obtermos um pó secco, que agitavamos



com ether de petroleo á temperatura ambiente; disso resultava a dissolução das substancias "A", "C" e da sitosterina, assim como da maior parte do oleo não crystallizavel. No residuo permanecia, além do sulfato de sodio, principalmente a substancia "B", e tambem uma quantidade diminuta de um corante soluvel em alcool. Esse residuo era completamente extrahido com ether de petroleo, quer no apparelho de Soxhleth, quer num extractor construido a proposito para esse fim; a operação em certos casos podia demorar de 2 a 3 dias. Pela refrigeração do soluto obtinhamos a substancia "B" em forma de lindos crystaes um tanto amarellos, os quaes geralmente fundem a 152-155°C. Uma segunda extracção com ether de petroleo, sem tomar em consideração o primeiro extracto, dava crystaes brancos de ponto de fusão 155-157°, o qual não se modificava com as recrystallizações subsequentes.

Para a obtenção das substancias "A", "C" e sitosterina da fracção soluvel em ether de petroleo frio, libertava-se o extracto, completamente, do dissolvente. no vacuo, e aquecia-se o residuo com alcool. Por refrigeração separava-se a sitosterina do soluto. Para obtel-a na integra, era necessario repetir esse tratamento. Concentravam-se então os filtrados reunidos por evaporação e, triturando-se o residuo com acetona ou ether acetico, obtinha-se o producto "C" em forma de crystaes, enquanto "A" ficava no soluto. A substancia "A" obtinha-se depois, recrystallizando-se o residuo da evaporação com um pouco de ether de petroleo. Sua purificação era feita pela recrystallização com um pouco de ether de petroleo ou mistura de alcool-agua. Desse modo, apparecia em forma de agulhas branquissimas com o ponto de fusão 114-116°, facilmente soluveis em todos os dissolventes organicos. A substancia "C" é menos soluvel. Ella crystalliza facilmente em acetona, ether acetico ou alcool, e tem, após varias purificações, um ponto de fusão constante de 129-130°.

As propriedades de solubilidade da substancia "B", como é natural, foram estudadas mais cuidadosamente já que a quantidade á nossa disposição era bem superior a dos outros productos. É ella facilmente soluvel em ether, methanol, alcool, chloroformio, acetona, acido acetico glacial, anhydrido acetico, pyridina; um pouco menos soluvel em benzol; pouco em ether de petroleo quente e cyclohexana; quasi insoluvel em ether de petroleo frio e completamente insoluvel em agua. É recrystallizada vantajosamente, do modo indicado, em ether de petroleo, assim como em cyclohexana e em soluto concentrado de benzol. Das misturas de ether, acetona e ether acetico com muito ether de petroleo foi ella obtida em forma de lindos crystaes, muitas vezes após separação inicial de um oleo. De misturas de alcool, acetona, methanol ou acido acetico com agua obtem-se igualmente em estado crystallino. Sua tendencia para a crystallização é já bastante pronunciada em seu estado natural, embora possa surgir, p. ex., no ether de petroleo, uma grande supersaturação. Essa substancia é insensivel ao ar.

pouco sensivel á luz, em cujo contacto ella se torna ligeiramente amarella ao cabo de poucos dias. Os acidos, quer diluidos, quer concentrados, dostroem-na rapidamente; no entanto, ella resiste aos alcalis, mesmo a quente.

Conseguimos encontrar uma linda e caracteristica reacção de côres para a substancia "B", a saber: dissolver uma particula desse producto em alcool, e addicionar uma gotta de acido concentrado; immediatamente se apresenta um lindo jogo de côres (ás vezes é necessario aquecer), que passa pelo roseo, vermelho, violeta, azul e, finalmente, azul esverdeado. Pela reacção de Liebermann-Burchard, consegue-se passar de roseo para vermelho pallido; com a reacção de Salkowski, o acido sulfurico se torna vermelho, enquanto o chloroformio permanece incolor.

Embora a substancia "B" seja insoluvel em agua, mandamos fazer uma prova physiologica, em vista de se acharem contidas no insaponificavel das gorduras certas substancias activas como as vitaminas e os hormonios. É sabido que a fracção gordurosa no oleo de côco contém uma quantidade elevada de estrona, producto de oxydação do hormonio sexual feminino, com elevado effeito hormonico.

Na secção de Physio-pathologia do Instituto, o prof. Thales Martins teve a gentileza de fazer experiencias physiologicas preliminares com a nossa substancia "B", com o seguinte resultado: camondongos femeos castrados, tratados com uma dose total de 2,5 mgs. do producto "B" apresentaram phenomenos typicos de cio; doses maiores provocavam-lhes a morte; experiencias em ratos machos castrados, mesmo com a administração de doses de approximadamente 300 mgs. por animal, não deram effeito visivel. Ainda que estes resultados devam ser tomados como provisorios, são sufficientemente interessantes para proseguirmos no estudo.

O esclarecimento chimico da substancia "B" é naturalmente o nosso problema mais interessante, para cuja solução se nos deparam por enquanto difficuldades inesperadas. Purificámos energicamente essa substancia através de muitas recrystallizações, e a analyse realizada com essa substancia, purissima, levou-nos á supposição de que lhe cabe a formula bruta $C_{32}H_{44}O_5$. O peso molecular é, portanto, calculado em 508. As primeiras determinações do peso molecular foram executadas em canfora e accusaram valores instaveis e nada seguros. Dahi se deduz que o producto "B" não é sufficientemente soluvel em canfora, ainda que isto não se possa descobrir a olho nú. As determinações de peso molecular realizadas com exaltona deram valores pouco seguros. Finalmente, a srta. dra. Carst realizou, em nosso laboratorio, determinações do peso molecular em escala semi-micro com benzol, as quaes accusaram pequenas diver-

gencias entre si, com o valor medio de 482, que concorda satisfactoriamente com o valor admittido de 508. No entanto, não queremos considerar a formula e o peso molecular como completamente seguros. Admittindo-se a formula $C_{32}H_{44}O_5$ como certa, poderiamos estabelecer a funcção de 5 atomos de oxygenio. Até agora ainda não o conseguimos. Executámos micro-reacções sobre grupos hydroxylicos alcoolicos e phenolicos, grupos carboxylicos e sobre methylcetonicos, todas com resultados negativos. Segundo Zeisel, não se obtém iodeto de methyla com acido iodhydrico; porisso nenhum grupo methoxylico pode estar contido na molecula. Do mesmo modo, as pesquisas de configuração lactonica foram negativas. Como é natural, já se tinha provado que a substancia "B" não continha nitrogenio, enxofre ou halogenio.

Em nossas experiencias, para obter derivados crystallizados por meio dos reagentes cetonicos (hydroxylamina, semicarbacida) só recuperavamos o material original; no entanto, conseguimos levar a substancia "B" á reacção com anhydrido acetico em presença de acetato de potassio. Da mistura de reacção obtivemos uma substancia com o ponto de fusão de 163,5 — 165°, a qual, misturada com o material original, produzia uma grande depressão do ponto de fusão. Essa substancia é facilmente soluvel em ether de petroleo e, ao resfriar, apparece em forma de longas agulhas. Dispondo-se de um soluto impuro, obtêm-se sempre crystaes amarellos, os quaes podem ficar em branquissimos por sublimação no vacuo de 0,02 mm. a uma temperatura de 150°. Essa substancia é insensivel á luz e ao ar.

As analyses realizadas com essa substancia, que provisoriamente queremos chamar de "B-2", correspondem perfeitamente a formula $C_{22}H_{30}O_4$. Seu peso molecular, portanto, é calculado em 358, sendo que o valor medio das determinações de peso molecular feitas pela dra. Carst é 369, de modo que conferia bem com o valor exigido.

Tratámos a substancia "B-2" em soluto alcoolico á temperatura ambiente, bem como numa temperatura superior, com potassa titulada, e medimos o consumo em potassa por titulação. Titulando-se immediatamente após a addição da potassa, não se observava consumo algum da potassa. No decurso de 90 minutos 81,4 mgs. de substancia "B-2" consumiam 2,22 cc. de potassa N/10: isto correspondia a um peso equivalente de 367. No tratamento ao calor verificou-se um peso equivalente de 368. Temos, pois, elementos para suppor tratar-se de *uma lactona da formula* $C_{22}H_{30}O_4$. Esta lactona não contém nenhum grupo acetylico, o que torna pouco provavel a presença de um grupo primario ou secundario de hydroxylas. O sal sodico do acido correspondente á lactona com certeza passa, transitoriamente, pela acidulação para acido livre, o qual a seguir dá logar novamente ao annel lactonico, pois, logo após a acidulação, se consegue recuperar toda a lactona crystallizada.

Enquanto não soubermos algo de definitivo sobre a constituição chimica da substancia "B-2", não queremos fazer supposições sobre a marcha tão original da reacção, a qual se desenvolve sob a acção do anhydrido acetico sobre a substancia "B". Parece, porem, que encontrámos com essa reacção provavelmente a unica base existente para o esclarecimento da constituição da substancia "B".

Comparando-se a formula bruta da substancia "B" com a substancia "B-2", vê-se que na mistura de reacção com acido acetico anhydrico ha de existir ainda uma ou varias substancias com um total de 10 atomos de carbono.

Conseguimos realmente insular mais uma substancia, embora em quantidade insufficiente para uma analyse minuciosa. Procedémos do seguinte modo: admittindo-se que, na reacção com anhydrido acetico, além da lactona "B-2", se tenha formado um alcool da substancia "B", forçosamente elle tinha que estar contido na mistura em forma de um acetato. Porisso, aquecémos a mistura com alcali; o soluto apresentou então um odor aromatico. Destillando com vapor de agua, obtivemos um destillado turvo, com um odor ainda mais pronunciado. Extrahimos o destillado com ether, e do soluto etherico secco pudemos obter uma substancia branca crystallina por meio de concentração ao vacuo, a qual dava micro-reacções, altamente positivas, de um alcool. A reacção de phenoes era negativa. Nenhum successo tiveram por enquanto nossos ensaios, quanto á obtenção, em maiores quantidades, dessa substancia, que procurámos crystallizar, para esse fim, directamente da mistura de reacção, em forma de seu acetato, visto que, embora tenhamos podido crystallizar o acetato, até hoje ainda não nos foi possivel purifical-o convenientemente. Estamos occupados com o exame da marcha da reacção com anhydrido acetico, e com o esclarecimento da constituição dos productos de desdobramento dahi resultante, tencionando mais tarde publicar novos trabalhos a respeito.

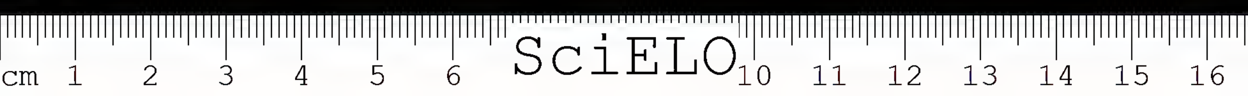
Descripção das experiencias

Obtenção e divisão do insaponificavel do café crú.

Café crú foi ligeiramente seccado por aquecimento cuidadoso e depois moido em um desintegrador.

24 kgs. desse material foram extrahidos com ether em tres porções iguaes em um extractor de prateleiras, exigindo essa operação de 24-36 horas. Dos extractos filtrados foi evaporado o dissolvente. O residuo total pesava 1.730 gs. = 7,2%.

Dividido o residuo em tres porções foi addicionado a cada uma 1 litro de ether de petroleo, ficando o soluto, destinado á separação da cafeina, em repouso



durante uma noite na geladeira. Foi filtrada então, por aspiração, a cafeina crúa contida em cada porção numa porcentagem approximada de 20 gs. = 0,25%, e retirado do filtrado o ether de petroleo, por evaporação.

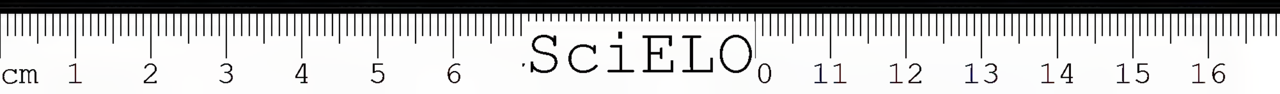
O residuo gorduroso de cada porção foi posto, ainda quente, a saponificar num soluto bem mexido, composto de 100 gs. de soda caustica commercial em 1 litro de agua, e o soluto bem misturado durante 6 a 12 horas. Foram addicionados então mais 2 litros de agua e 1,5 litro de alcool, continuando-se a mexer até a maior parte se dissolver. Reunidas as tres porções e juntada agua até perfazer 18 litros, procedeu-se á extracção com ether, durante tres dias, num grande extractor para liquidos. Para facilitar a separação das camadas, foi addicionada uma pequena quantidade de ether de petroleo. Lavou-se o extracto ethereo com agua, seccou-se com sulfato de sodio e expulsou-se o dissolvente por destillação. O insaponificavel assim obtido pesava 148,5 gs. = 0,62% do café = 8,6% da graxa.

O insaponificavel crystallizou depois de permanecer um dia na geladeira; foi triturado com sulfato de sodio secco; para chegar a uma mistura adequada foram precisos 250 gs. de sulfato de sodio. Essa mistura foi agitada na machina com ether de petroleo (70-90°), filtrada e o residuo tratado de modo semelhante. A essa fracção, facilmente soluvel em ether de petroleo frio, demos o nome de fracção *a*. Fracção *b*, insoluvel em ether de petroleo frio, deve ser extrahida, com ether de petroleo fervente, da mistura com sulfato de sodio, durante varios dias, num apparelho Soxhlet. Depois de resfriado na geladeira o soluto, separou-se um total de 67 gs. = 0,28% da substancia B, que se apresentava amarellada, quasi branca, e fundia a 152-155° C.

A fracção *a* contém a substancia A, C e sitosterina: evapora-se completamente o dissolvente, no vacuo. O residuo, um oleo castanho-avermelhado transparente, é triturado com alcool quente. Ao resfriar, separa-se a sitosterina. Concentra-se então por evaporação o soluto-mãe e repete-se esse tratamento. As porções de sitosterina reunidas são recrystallizadas em alcool e fundem então a uma temperatura de 134-135°.

Expelle-se completamente o dissolvente do soluto-mãe da sitosterina, e tritura-se o residuo com acetona ou ether acetico; com isso crystalliza a substancia C, que se obtém, depois de varias recrystallizações em acetona ou ether acetico em forma de crystaes quasi brancos com p. f. 128-129°.

Para a obtenção da substancia A concentra-se o soluto-mãe da substancia C, pondo-se o residuo a crystallizar com ether de petroleo. Uma vez purificada por meio de recrystallização com um pouco de ether de petroleo, a substancia funde a 114-116°. Ella crystalliza em forma de agulhas curtas, branquissimas



Analyses da substancia B.

5,003 mgs. subst. perderam a 60° no a v., 0,076 mgs. H_2O
4,862 mgs. " " a 100° " " " 0,130 mgs. H_2O
60° :1.52% H_2O; 100°: 2.67% H_2O
4,927 mgs. subst.: 13,615 mgs. CO_2; 3,860 mgs. H_2O; 0,019 mgs. residuo.
4,732 mgs. " : 13,140 mgs. CO_2; 3,710 mgs. H_2O.

Achado: C = 75,66% H = 8,80%
C = 75,73% H = 8,77%

Calculado: $C_{32}H_{44}O_5$ (508) C: 75,58% H: 8,66%

Determinação do peso molecular em benzol.

(DRA. CARST)

Concentração:	1,63	1,27
Peso molecular:	472	493

Media: 482

Numa experiencia executada com o café torrado, pudemos de 500 gs. insular 7,0 gs. de insaponificavel crú, sendo o café empregado rico em gorduras. Conseguimos obter do insaponificavel a substancia B e a substancia A em forma crystallina. Não fizemos pesquisa de outras substancias, visto que naquella occasião não tinhamos ainda elaborado o processo de separação descripto para o insaponificavel.

Experiencias physiologicas com a substancia B.

(PROF. THALES MARTINS)

Seis camondongos femeos castrados foram injectados, no decurso de tres dias, cinco vezes com quantidades diversas de um soluto a 1,19% da substancia B em oleo de sesamo. Os camondongos 3 a 6 morreram no decurso da experiencia.

Camondongo 1: recebeu cada dia 0,6 cc., total 1,8 cc..

Camondongo 2: recebeu cada dia 0,8 cc., total 2,4 cc..

Os dois camondongos accusaram, desde o quarto ao oitavo dia, prova de Allen-Doisy positiva. Elles tinham recebido, respectivamente, 2,14 mgs. e 2,85 mgs. de substancia B.

Dois ratos machos receberam desde o sexto ao vigesimo dia após a castração, cada dia, respectivamente, 0,1 cc. e 0,2 cc. de um soluto a 10% da substancia B em oleo de sesamo. O primeiro animal recebeu uma dose total de 140 mgs.;

o segundo 280 mgs.. Tres dias após a injecção matámos os animaes com ether; os pesos concordavam mais ou menos com o do animal de controlo.

Laudo da necropsia: Bom estado geral, nenhuma lesão macroscopica, genitalia atrophiada.

Desdobramento da substancia B com anhydrido acetico.

2 gs. de substancia B foram aquecidos com 1 g. de acetato de sodio e 10 cc. de anhydrido acetico, em banho-maria, durante meia hora, despejando-se, então, 50 cc. de agua, com o que o precipitado, a principio oleoso, se crystallizou immediatamente. O material foi filtrado depois de repouso na geladeira, comprimido fortemente e recrystallizado em duas porções de 100 cc. de ether de petroleo (70-90°), donde se obteve 1,22 gs. de crystaes amarellos bem formados. Com relação ao peso molecular, representa elle 79,7% do theorico.

O filtrado do producto de desdobramento B-2 foi alcalinizado primeiramente com soda caustica diluida, e depois com um soluto concentrado de carbonato de sodio. Destillaram-se então do soluto, 2 vezes, 100 cc. de agua; a primeira fracção tinha um cheiro fortemente aromatico. Ella foi extrahida no extractor com ether e o ether seccado com sulfato de sodio, durante a noite e então destillado. O residuo, a principio lacteo turvo, crystallizou-se, solidificando-se na geladeira em um precipitado branco microcrystallino, o qual, tratado segundo Feigl com anhydrido acetico, hydroxylamina e ferri-ião, *deu reacção dos alcooes altamente positiva.*

Sublimou-se para a analyse a substancia B-2 em alto vacuo de 0,02 mm.: ella passou numa temperatura de 150° do banho de oleo. O sublimado branco foi recrystallizado duas vezes com ether de petroleo, com o que se obteve a substancia em forma de grandes prismas uniformes, incolores, p.f. 163,5 — 165°.

Analyses da substancia B-2.

Determinação do peso molecular em benzol.

(Dra. Carst)

Concentração:	0,9	1,6	2,3%
Peso molecular:	367	361	381

Media: *369*

4,639 mgs. subst. 5,337 mgs. subst. perderam, a 80° no a. v., 0,28 mgs. 0,21 mgs. H_2O

4,611 mgs. " : 12,480 mgs. CO_2, 3,430 mgs. H_2O

5,316 mgs. " : 14,370 mgs. CO_2, 4,000 mgs. H_2O

Achado:		C = 73.81%	H = 8.32%
		C = 73,72%	H = 8.42%
Calculado:	$C_{22}H_{30}O_4$ (358)	C : 73.74%	H : 8.38%

Titulação lactonica da substancia B-2.

87.3 mgs. substancia B-2 foram dissolvidas em 5 cc. de alcool absoluto e addicionados de 2 cc. N/2 NaOH (F: 1.059). Juntamente com uma prova em branco, foi aquecida num banho-maria durante 1½ hora, accrescentando-se então tres gottas de phenolphtaleina; titulação com N/10 HCl:

Controlo:	7,38 cc.
Substancia B-2:	7,38 cc.

O consumo de 2,37 cc. N/10 NaOH para 87,3 mgs. corresponde a um

Peso equivalente de 368.

Deixamos repousar 81,4 mgs. de substancia B-2 em um soluto de alcool absoluto á temperatura ambiente com N/10 NaOH, e depois de 15, 30, 60 e 90 minutos, titulamos em camparação á uma prova em branco:

Consumo de soda caustica depois de

15	30	60	90 minutos:
1,30	0,64	0,23	0.05 cc.

O consumo total de 2,22 cc. de soda caustica corresponde a um

Peso equivalente de 367.

Analyse da substancia A.

4,208 mgs. subst. perderam, a 60° em a. v., 0,158 mgs. H_2O.
3,969 mgs. " " a 60° em a. v., 0,140 mgs. H_2O.

4,050 mgs. subst. : 11,885 mgs. CO_2. 3,750 mgs. H_2O
3,829 mgs. " : 11,225 mgs. CO_2. 3.580 mgs. H_2O

Achado:	H_2O = 3,76%	C = 80.03%	H = 10.36%
	H_2O = 3,53%	C = 79.95%	H = 10,46%
Calculado:	$C_{22}H_{34}O_2$	C = 80,00%	H = 10,31%

RESUMO

Na fracção insaponificavel do oleo do café existem tres substancias até agora desconhecidas. Essas substancias, agora descobertas, podem ser chamadas de A, B e C. A substancia A occorre no café na porcentagem de 0,03%; a substancia B, na de 0,3%; a substancia C, na de mais ou menos 0,001%. Além dessas substancias poude-se insular, tambem, numa phase de separação cuidadosamente orientada, a sitosterina em estado chimicamente puro. Além desta é provavel que no insaponificavel haja outras substancias crystallizaveis.

Descrevem-se as qualidades chimicas e physicas da substancia B, assim como o resultado da verificação physiologica preliminar de sua actividade estrogenica. Para a substancia, que funde a 155-157°, discute-se a possibilidade de ser $C_{32}H_{44}O_5$ a sua formula. Pela acção do acido acetico anhydrico, poude-se extrahir um producto de desdobramento com a formula $C_{22}H_{30}O_4$, com a propriedade de uma lactona, tendo na mesma reacção surgido um outro corpo crystallizado, com forte reacção positiva de um alcool.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wird ueber die Auffindung von drei, bisher unbekannten Substanzen in der unverseifbaren Fraktion des Kaffeefettes berichtet. Substanz A ist im Kaffee zu 0,03%, Substanz B zu 0,3% und Substanz C zu etwa 0,001% enthalten. Ausser diesen Substanzen liess sich in einem gut durchgearbeiteten Trennungsgang auch Sitosterin in reiner Form isolieren; die Anwesenheit weiterer kristallisierbarer Substanzen im Unverseifbaren ist wahrscheinlich.

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Substanz B werden beschrieben, sowie das Ergebnis der vorlaeufigen physiologischen Pruefung auf oestrogene Wirksamkeit. Fuer die Substanz, die bei 155-157° schmilzt, wird die Formel $C_{32}H_{44}O_5$ diskutiert. Durch Behandlung mit Essigsaeure-anhydrid liess sich aus ihr ein Abbauprodukt der Formel $C_{22}H_{30}O_4$ gewinnen, das die Eigenschaften eines Lactons hat. In derselben Reaktion entsteht ein weiterer kristallisierter Stoff, der stark positive Reaktion auf Alkohole gibt.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Bengis, R. O. & Anderson, R. J.* — J. Biol. Chem. 47:99. 1932.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).

612.3932:591.11

EFFEITOS DO CHLOROGENATO DE POTASSIO E CHLOROGENATO DE POTASSIO E CAFEINA SOBRE O CORAÇÃO DO SAPO, *BUFO MARINUS*

POR

J. R. VALLE

Introducção

A Pharmacodynamica dos constituintes do café, exclusive a cafeina, apenas está esboçada e poucos são ainda os trabalhos relativos ao acido chlorogenico, obtido em 1849 por Payen, de alto teor no infuso e condicionante, segundo alguns, do gosto forte da bebida.

O acido chlorogenico, $C_{16}H_{18}O_9 + 1/2\ H_2O$, de peso molecular 363, existe livre e combinado no café, sob a forma de um sal de potassio e de um complexo instavel com a cafeina.

Os solutos destes saes em liquido de Ringer ou de Clark, em pH 7.4, da preparação fornecida pela Secção de Chimica do Instituto, têm côr verde-clara, que passa, no fim de algumas horas, para o verde-escuro e, depois, para o castanho. Esta mudança depende do desdobramento do acido chlorogenico em acidos cafeico e quinico e coincide com baixa pequena da alcalinidade do liquido physiologico empregado.

Lendrich (1) affirma serem menos toxicos os productos de desdobramento do acido chlorogenico e, porisso, preconiza o emprego do "Café-Idéa" (Idee Kaffee"), isento de chlorogenatos. Sómente este dado traduz a importancia pratica do estudo pharmacodynamico dos acidos chlorogenico, quinico e cafeico.

Neste trabalho, cuidaremos do primeiro, sob as duas formas de chlorogenato de potassio e de chlorogenato de potassio e cafeina. Entretanto, como ha decomposição destes saes em meio alcalino no fim de algum tempo, verificamos tambem os effeitos de solutos antigos como introducção para o estudo posterior do quinato e do cafeato de potassio.

Segundo as experiencias de Seel (2), é a seguinte a ordem de toxicidade decrescente das substancias referidas: acido quinico, acido cafeico, acido chlorogenico, acido chlorogenico-cafeina e, finalmente, cafeina. Conforme Kochmann (3), não são toxicas as doses *per os* de 1 g. de acido chlorogenico por kg. de coelho e de 70-85 mgs. por 20 gs. de rato.

Estudando os effeitos do acido chlorogenico, do chlorogenato de potassio e do complexo, injectados pela via intravenosa em pombos, cães e coelhos, verificámos a pequena toxicidade destas substancias.

Nenhum effeito foi observado nas doses de 20 mgs. do complexo por kg. de pombo, de 30 mgs. por kg. de coelho e de 50 mgs. por kg. de cão. Em uma cadella de 20 kgs. de peso injectámos, na saphena, 800 mgs. do complexo e, pouco depois, 370 mgs. de acido chlorogenico, tendo apenas observado pequena baixa da pressão arterial.

Technica

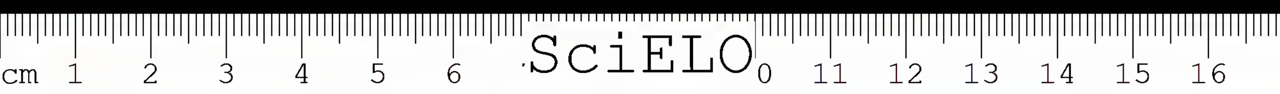
A acção do chlorogenato de potassio e do complexo chlorogenato de potassio e cafeina foi estudada sobre o coração "in situ" e insulado do sapo, *Bufo marinus*:

a) Cardiographia do sapo, coração "in situ", effeitos da injecção intravenosa (veia abdominal anterior).

b) Cardiographia do sapo, coração insulado, methodo de perfusão.

No primeiro caso, o coração era exposto e preso pela ponta a uma alavanca myographica leve, typo Harvard; introducção de uma canula na veia abdominal anterior, para facilitar as injecções feitas lentamente e no volume maximo de 0.5cc..

No segundo caso, o coração insulado era suspenso por uma canula introduzida na veia cava e ligada por um tubo de vidro em Y e dois tubos de borracha a dois vasos de Mariotte de pressão constante. Um dos vasos continha soluto physiologico de Clark (pH 7.4) e o outro, o soluto a estudar, feito em



liquido de Clark e ajustada a concentração hydrogenio-ionica = pH. 7.4 (methodo colorimetrico). O liquido de perfusão deixava o orgão através das aortas seccionadas.

1) Chlorogenato de potassio. Os solutos foram obtidos a partir de um soluto "stock" a 1 % (ião chlorogenato), derivado do complexo pela extracção da cafeina com chloroformio. O soluto "stock", contendo de 0,001 a 0,01 % de 1-3-7 trimethyl, 2-6 dioxypurina, de pH 5.0 conservado em geladeira, permittia o facil emprego do sal, dada a sua difficil obtenção em substancia e a sua instabilidade em solutos alcalinos.

2) Complexo: chlorogenato de potassio e cafeina. Os solutos foram obtidos, partindo-se da substancia que é um pó amargo, não deliquescente e ligeiramente esverdeado.

Sabido que o peso molecular do complexo é 586 e 392 o do chlorogenato de potassio, para a mesma concentração de 1 % em ião chlorogenico 1.110 mgs. de chlorogenato de potassio correspondem a 1.660 mgs. do complexo.

O seguinte quadro mostra as modificações de côr e do pH de solutos recentes e antigos do chlorogenato de potassio e do complexo a 2°/oo, calculadas em ião chlorogenato, feitas em liquido physiologico de Clark, com a concentração H-ionica ajustada e deixadas á temperatura do laboratorio:

Solutos a 2°/oo (ião chlorogenato) em Clark	*Chlorogenato de potassio*		*Chlorogenato de potassio cafeina*	
	Coloração	*pH*	*Coloração*	*pH*
Soluto recente	Verde	7.5	Esverdeada	7.5
» após 24 hs. .	Verde escuro ...	7.6	Verde	7.5
» » 3 dias .	Castanho	7.4	Castanho	7.5
» » 6 » .	Côr de charuto .	7.3	Côr de charuto .	7.4

Resultados

Os effeitos do chlorogenato de potassio e do chlorogenato de potassio e cafeina são comparaveis qualitativamente: em pequena concentração reduzem a amplitude systolica, e, em concentração maior, provocam disturbios da conducção, como bloqueio auriculo-ventricular, extra-systoles e parada diastolica do coração. Estes phenomenos são obtidos mais facilmente no coração insulado e independem da atropinização previa. O quadro e os graphicos annexos objectivam os resultados experimentaes. A acção cardio-depressora do chlorogenato de potassio e do complexo é pouco pronunciada, mesmo na diluição de 0.5 %, quando as substancias são injectadas na veia abdominal anterior.

Os effeitos do chlorogenato de potassio e do complexo a 0.5 % sobre o coração insulado são discretos (Graphicos 1 e 2). Nas concentrações 1 e 2 por mil, a reducção da amplitude systolica, provocada pelas duas substancias, é bem nitida, tanto no coração normal, quanto no atropinizado. Os graphicos 3 e 4, 5 e 6 mostram ainda que, na mesma concentração calculada em chlorogenato, o complexo agiu de maneira menos pronunciada do que o chlorogenato de potassio. Tambem Seel, em 1935, assignalou a desintoxicação do acido chlorogenico pela cafeina, facto este expressamente referido pelo mesmo auctor num parecer sobre o "Idee-Kaffee".

A acção cardio-depressora do chlorogenato de potassio é bem evidente na concentração de 3°/oo (Graphico 7) e já o soluto a 1°/oo provoca disturbios da conducção (Graphico 8). De um modo geral, pudemos verificar ainda que os productos antigos, mormente de chlorogenato de potassio, contendo os productos de desdobramento do acido chlorogenico, eram mais toxicos para o coração insulado do sapo do que os solutos recentes. Assim, a passagem pelo coração, durante 75 segundos, do soluto recente de chlorogenato de potassio a 3°/oo provocou reducção de 70 % da amplitude systolica e parada diastolica de 60 segundos; o soluto antigo reduziu de 80 % a amplitude systolica e determinou uma parada diastolica de 20 minutos.

Um estudo comparativo entre os effeitos do chlorogenato, do cafeato e do quinato de potassio será feito, entretanto, posteriormente.

QUADRO

A) *Chlorogenato de potassio (Soluto ião chlorogenato)*	*Tempo de passagem do soluto*	*Effeitos*
Sol. 0.5 ‰ (soluto recente) ...	55 segundos	Nenhum effeito apreciavel.
Sol. 0.5 ‰ (» de 2 dias) .	50 »	Reducção de 35 % da amplitude systolica.
Sol. 1 ‰ (» recente) ...	90 »	» » 30 %, com disturbios da conducção.
Sol. 2 ‰ (» ») ...	45 »	» » 60 %, » bloqueio e parada diastolica de 8"
Sol. 2 ‰ (» de vespera)	80 »	» » 40 %, » disturbios da conducção.
Sol. 3 ‰ (» recente) ...	45 »	» » 70 %, » » » »
Sol. 3 ‰ (» ») ...	75 »	» » 70 %, » parada diastolica de 60".
Sol. 3 ‰ (» de vespera)	30 »	» » 80 %, » » » » 20' e disturbios da conducção.
B) *Chlorogenato de potassio-cafeina*		
a) *Peso do complexo:*		
Sol. 0.2 ‰ (soluto recente) ...	170 »	Nenhum effeito apreciavel.
Sol. 0.2 ‰ (» de vespera)	220 »	» » »
Sol. 1 ‰ (» recente) ...	250 »	Reducção de 10 % da amplitude systolica.
Sol. 1 ‰ (» de vespera)	240 »	Disturbios da conducção, extrasystoles rythmadas; não houve reducção apreciavel da amplitude das contracções.
b) *Peso ião chlorogenato:*		
Sol. 0.5 ‰ (soluto recente) ...	105 »	Reducção de 15 % da amplitude systolica.
Sol. 0.5 ‰ (» de vespera)	80 »	» » 10 % » » »
Sol. 1 ‰ (» recente) ...	90 »	» » 50 % » » »
Sol. 2 ‰ (» ») ...	50 »	» » 65 % » » »
Sol. 2 ‰ (» ») ...	60 »	» » 20 % » » » e disturbios.
Sol. 3 ‰ (» ») ...	55 »	» » 60 % » » » » » da conducção, com parada diastolica de 20".

RESUMO

No presente trabalho são estudados os effeitos do chlorogenato de potassio e do complexo chlorogenato de potassio e cafeina sobre o coração insulado e "in situ" do sapo, *Bufo marinus*.

Proporcionalmente á dose empregada, estas substancias reduzem a amplitude systolica e provocam disturbios da conducção. Estes effeitos são mais pronunciados com o chlorogenato de potassio, do que com o complexo, mostrando as experiencias que a cafeina desintoxica o acido chlorogenico. Tambem os solutos antigos, contendo os productos de desdobramento deste ultimo, de um modo geral, revelaram-se mais toxicos do que os solutos recentes.

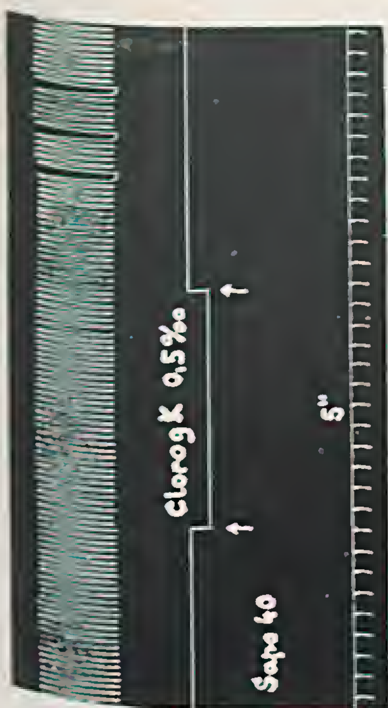
ABSTRACT

The effects of potassium chlorogenate and of potassium and caffein chlorogenate complex were investigated upon the heart, either isolated or *in situ*, of the toad *Bufo marinus*. It was found that these substances cause a reduction in the systolic amplitude and disturbances in the heart conductivity, proportionately to the dosage used of the substances, the former having a more marked action than the latter. The experiments also showed caffein to neutralize the toxic effects of chlorogenic acid, the splitting products of which appearing in old solutions render these more toxic than the recent ones.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Lendrich apud Seel, H.* — cit. infra.
2. *Seel, H* — Zur Pharmakodynamik einiger Bestandteile des Kaffees — Die Med. Welt (40).1935 (Sep.).
3. *Kochmann, M.* — Kann die Chlorogensäure im Kaffee Giftwirkungen entfalten? — Die Med. Welt (17).1934 (Sep.).

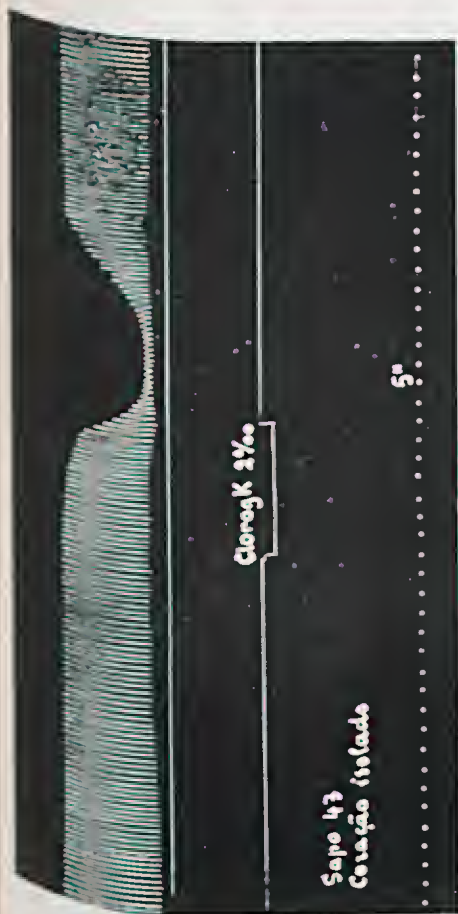
(Trabalho do Laboratorio de Pharmacologia do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).



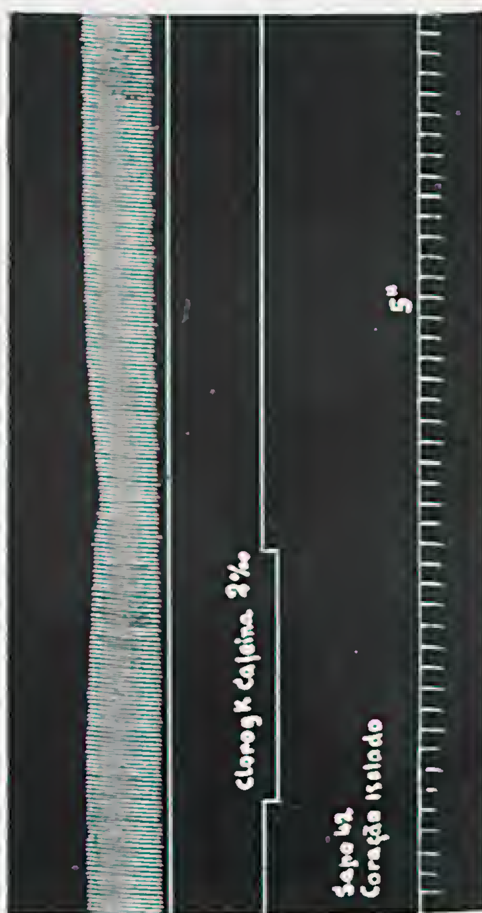
Graphico 1



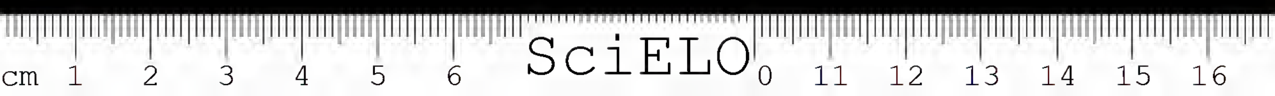
Graphico 2



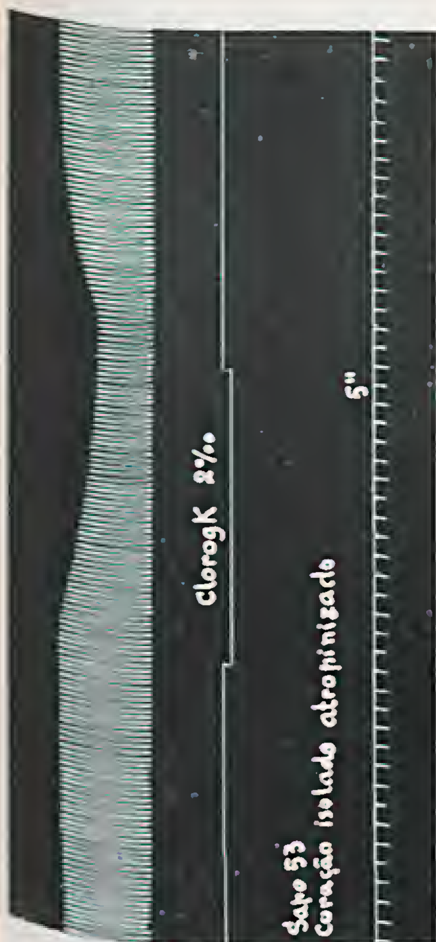
Graphico 3



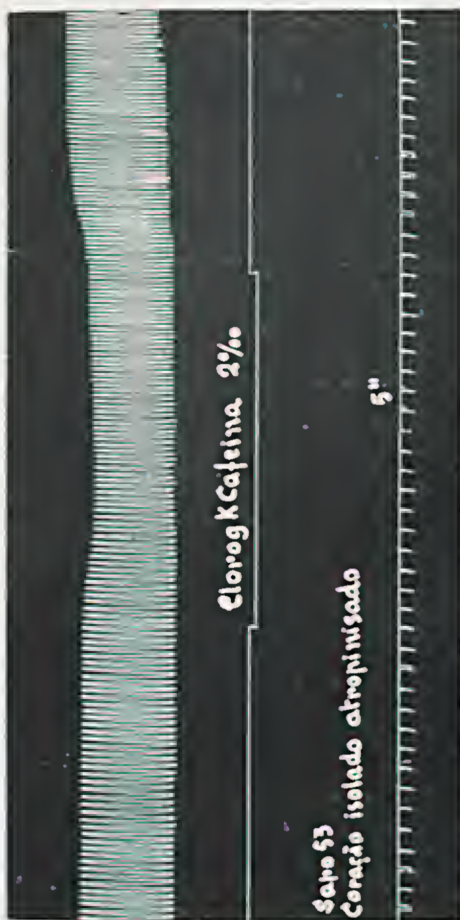
Graphico 4


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
0 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937



Graphico 5



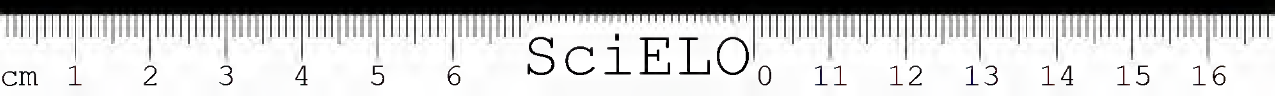
Graphico 6



Graphico 7



Graphico 8


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

612.3141:615.94:597.8

ESTUDOS SOBRE OS VENENOS DE SAPOS BRASILEIROS

1. Composição do veneno de *Bufo marinus*

POR

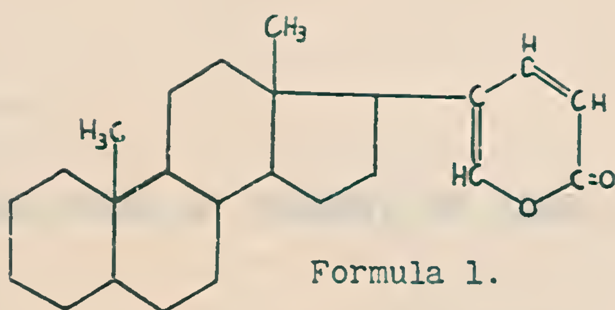
C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Desde ha muito as secreções glandulares das diversas especies de sapos que possuem effeitos toxicos sobre os animaes menores, especialmente sobre predadores e as cobras, têm sido objecto de numerosas pesquisas chimicas e pharmacologicas.

A pesquisa chimica das secreções começou a apresentar os primeiros successos, quando ha cerca de 25 annos, dois pesquisadores norteamericanos (1) conseguiram insular corpos crystallizaveis das secreções glandulares da especie *Bufo marinus*. Desde então se obtiveram substancias de especies de sapos de todo o mundo, todas differentes entre si e tambem não identicas ás substancias toxicas primeiramente insuladas de *Bufo marinus*.

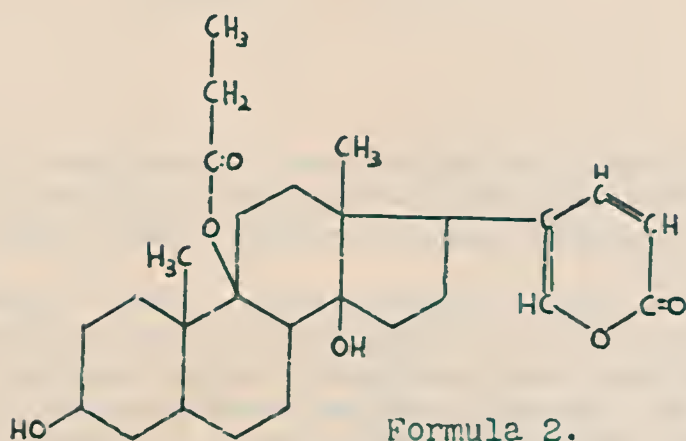
O progresso essencial no campo dos venenos de sapos em geral deu-se com os estudos de Heinrich Wieland em Munich, que se extendem através dos ultimos 20 annos (2a-g). Elle verificou, em varias especies, que as substancias de importancia physiologica contidas nos venenos de sapos sempre pertencem a duas differentes classes de corpos: as *bufaginas neutras* (formula 1), que representam esterinas com um annel lactona, e as *bufoteninas* basicas (formula 3), que são oxy-indolyl-ethyl-aminas.

A bufagina encontra-se, em parte, livre e, em parte, ligada á suberyl-arginina; neste ultimo caso, trata-se de *bufotoxinas*. As indolyl-ethyl-aminas são bases em parte terciarias, em parte quaternarias; no ultimo caso falamos de *bufotenidinas*. De cerca de 15 venenos de sapos differentes insularam-se, ou as mesmas substancias toxicas, ou substancias ao menos muito semelhantes a estas. É de extranhar



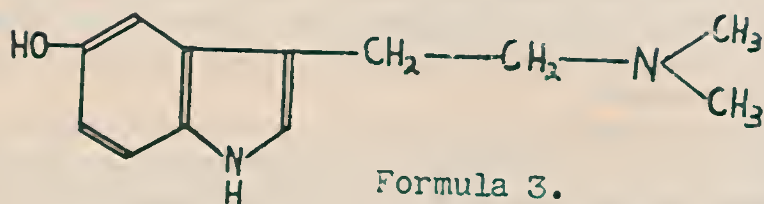
Formula 1.

Esqueleto das bufaginas.



Formula 2.

Marino-bufagina.



Formula 3.

Bufotenina.

que, justamente acerca da bufagina da especie de sapos examinada em primeiro logar, isto é a *marino*-bufagina, não se haja ainda chegado a um accordo. E mesmo, quanto ás formulas brutas da *marino*-bufagina, foram registados por parte dos americanos, durante os ultimos annos, resultados muito divergentes.

Porisso, foi de interesse especial para nós o facto de a especie *Bufo marinus* ser tão abundante e representar não só em Jamaica, como tambem no Brasil, grande parte da população dos sapos. Entre nós, num grupo de 1000 sapos remettidos ao Instituto Butantan, 940 correspondem a *Bufo marinus*, 57 a *Bufo paracnemis*, e 3 a *Bufo crucifer*. Temos, por isso, abundancia de veneno de *Bufo marinus*, o que seduzia, pelas razões já mencionadas, a um novo estudo desta substancia afim de enfrentarmos as questões pendentes.

Preparo do veneno. Procediamos do seguinte modo: o veneno era extrahido á mão e seccado ao ar, na geladeira, depois de addicionadas algumas gottas de chloroformio. Em seguida, as secreções, em forma de crostas, eram trituradas e seccadas, durante alguns meses, em deseccadores a vacuo, até se tornarem pulverizaveis. O pó impalpavel, pardo claro, e que produz esternutações, era guardado num deseccador a vacuo.

Assim obtivemos 180 gs. de veneno de 2500 exemplares, tendo uma parte, aliás, sido extrahida duas vezes — ou seja por animal, uma media de cerca de 75 mgs. de secreção secca.

Pudemos verificar que, tambem no caso do nosso veneno, obtivemos os melhores resultados pelo methodo indicado por Wieland (2g), no anno passado, para a elaboração do veneno de *Bufo vulgaris*. Pareceu-nos, porém, necessario incluir mais uma serie de purificações subsequentes, afim de se chegar a productos completamente uniformes e garantidamente livres de impurezas.

A elaboração foi executada na seguinte sequencia:

1) Secreção, extrahida com chloroformio.

Residuo, utilizado na extracção de elementos basicos.

2) Extracto concentrado, precipitado pelo ether de petroleo.

3) Precipitado recrystallizado de methanol aquoso.

4) Bufagina natural em acetona, filtrada sobre oxydo de aluminio e eluida com chloroformio.

5) Residuo secco do filtrado, recrystallizado de methanol e agua.

6) Recrystallização com alcool absoluto: ether absoluto: ether de petroleo.

7) Absorpção sobre oxydo de aluminio como em 4., e eluição com chloroformio.

8) Residuo secco do filtrado, recrystallizado de alcool-agua.

9) Nova recrystallização de alcool-agua.

10) Dissolução em acetona e filtração através de um pouco de oxydo de aluminio.

11) Addição de agua em excesso, a quente, ao filtrado.

Segundo este methodo, obtivemos a bufagina em forma de uma substancia perfeitamente branca, de crystallização homogenea e de ponto de fusão definido, a qual se manteve constante mesmo após recrystallizações repetidas. Verificamos da tabella I que o ponto de fusão, a rotação optica e os dados analyticos são um pouco differentes dos indicados por auctores que já trabalharam sobre este assumpto.

TABELLA I

	Ponto de fusão		*%C*	*%H*
Abel & Macht (1)	217-218°	+ 11°	70,99	8,26
Jensen & Chen (3)	212-213°	———	71,89	8,05
Auctores	205,5-208,5°	+ 9,3°	70,79	8,16

A formula $C_{24}H_{32}O_5$, que ultimamente parece não merecer mais nem a confiança do proprio auctor, não entra em consideração, porque o peso molecular já anteriormente determinado, é de cerca de 450, ao passo que se calcula sobre aquella formula um peso molecular de 400. Determinámos, por titulação do grupo lactonico, o peso equivalente como sendo 478, resultado este que exclue completamente a formula com 24 atomos de carbono e só permitte a discussão sobre as formulas com 28 ou 27 atomos de carbono.

TABELLA II

Calculado sobre	$C_{28}H_{36}O_6$:	C :	71,80%	H : 7,70%
» »	$C_{24}H_{32}O_5$:		72,00%	8,00%
» »	$C_{27}H_{36}O_6$:		71,01%	7,95%
» »	$C_{27}H_{38}O_6$:		70,73%	8,36%
Achado:			70,79%	8,16%

A formula $C_{28}H_{36}O_6$ não pode estar certa, conforme mostram as nossas analyses, as quaes na tabella II foram compostas em proporção, comparativamente aos teores calculados para as formulas em apreço. Resta, portanto, sómente a discussão acerca das formulas com 27 atomos de carbono. Mesmo que, havendo um peso molecular tão elevado, não se possa decidir só pela analyse si ha 2 atomos de hydrogenio mais ou menos, a formula $C_{27}H_{38}O_6$ se apresenta como a mais provavel de todas, como se vê da tabella II. Contudo, a *marino*-bufagina differe por um CH_2, da *vulgaro*-bufagina, já melhor elucidada em sua constituição. A supposição de se tratar simplesmente de uma *vulgaro*-bufagina com um oxygenio methylado foi afastada pela determinação do grupo methoxyla, effectuada pe-

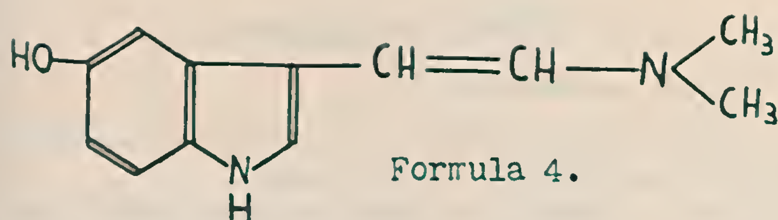
Srta. dra. Carst em nosso laboratorio. Provavelmente, a *marino*-bufagina difere da *vulgaro*-bufagina, por ter a primeira um radical propionyla no mesmo logar em que a ultima possue um radical acethyla. Pudemos determinar 2 atomos de oxygenio no grupo lactona, alem de um grupo alcoolico secundario, pela formação de um acetato; o quarto atomo de oxygenio encontra-se no grupo propionyla, enquanto que o ultimo atomo de oxygenio deve estar contido em um grupo hydroxyla terciario. Até o momento, os nossos resultados estão bem de accordo com a formula 2.

Parece-nos que a formula com 24 atomos de carbono, defendida por Jensen e Chen (3a), se refere a um corpo do qual se desprendeu o radical propionico, total ou parcialmente, por seccagem demasiado intensa; assim, as analyses estariam perfeitamente de accordo.

Quanto ás substancias basicas contidas no veneno, obtivemol-as, extrahindo com methanol o residuo da extracção com chloroformio (vide acima).

Ao contrario do que acontece com os venenos das outras especies de sapo, o veneno de *Bufo marinus* não continha nenhuma base, que pudesse ser extrahida do soluto alcalino com ether. A unica base que obtivemos dessa fracção, por precipitação com acido picrico, era differente da bufotenina e bufotenidina, em suas propriedades, tanto chimicas, como physicas. A base precipitou-se como picrato amarello, facil de purificar. Este picrato, quando molhado com alcool, contendo acido chlorhydrico, se transforma em um picrato de cor vermelha brilhante, com o mesmo ponto de fusão. Partindo do picrato, que crystalliza com uma molecula de agua de crystallização, produzimos o flavianato, e ambos os saes foram analysados.

Das analyses resultou claramente que ao corpo deve ser attribuida a formula $C_{12}H_{14}ON_2$. Estes dados, em conjuncto com as propriedades do hydrochloreto e do hydriodeto, que tambem produzimos, asseguram ao corpo a constituição da formula 4. Esta base é a substancia fundamental da bufothionina, um producto



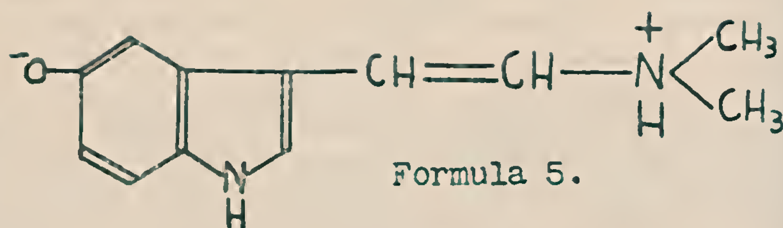
Formula 4.

Dehydro-bufotenina.

accessorio, contendo enxofre, do veneno de uma especie argentina de sapos. Sua constituição já foi estabelecida, desde que Wieland conseguiu transformal-a em *vulgaro*-bufotenina, por hydrogenação da ligação dupla, sendo a constituição desta

substancia assegurada por synthese. Portanto, convem denominar a base da secreção de *Bufo marinus* de *dehydro-bufotenina*. A formula desta substancia está bem de accordo com a formação dos 2 picratos, tambem observada no caso da bufotenina: no picrato vermelho, o acido picrico está ligado ao atomo de nitrogenio que se encontra no annel; no picrato amarello estavel está ligado ao grupo amino aliphatico.

Mencionamos mais uma vez o facto estranho de não poder a base ser extrahida com ether do soluto alcalino, o que é possivel no caso da bufotenina, da qual só falta a ligação dupla. Poderiamos explicar isto do seguinte modo: a dupla ligação diminue a basicidade do grupo amino; o grupo amino, então fracamente basico, forma com o grupo hydroxyla phenolico, levemente acido, uma betaina, de modo que devemos escrever, com mais acerto, a constituição segundo a formula 5. Esta formula explica todas as propriedades do corpo de modo satisfactorio.



Betaina da dehydro-bufotenina.

Depois de concluidas as nossas experiencias, tivemos ensejo de conhecer um trabalho de Jensen e Chen (4), publicado no anno passado, no qual já era estabelecida a identidade entre esta base e a base resultante do desdobramento da bufothionina, sem indicação, porém, sobre a constituição destas substancias.

Descripção das experiencias

1. *Preparação da* **marino**-*bufagina*.

167 gs. de secreção completamente secca e pulverizada foram extrahidos durante varios dias com chloroformio isento de alcool.

O extracto foi concentrado no vacuo á temperatura ambiente até mais ou menos 100 cc., e, sob constante revolver, despejado em 1 litro de ether de petroleo. Deixou-se repousar varios dias na geladeira, aspirou-se a bufagina natural, ligeiramente pardacenta, seccando-se em seguida a uma temperatura de 100°. Seu filtrado, na concentração, já não deu mais quantidades aproveitaveis e foi, porisso, desprezado.

Recrystallizou-se a bufagina natural de methanol aquoso quente, aspirando-se depois de repousar varios dias na geladeira e deixando-se então seccar; seu peso era de 17,5 gs..

Dissolveu-se em acetona, fazendo-se atravessal-a uma columna de oxydo de aluminio (Brockmann) de uns 20 cm. de altura, e lavando-se depois com chloroformio. Sómente na superficie appareceu um annel estreito, sujo; o resto da columna estava incolor; o filtrado, ligeiramente amarello. Concentrou-se no vacuo á temperatura ambiente, obtendo 11,2 gs. de crystaes amarellados. Estes foram recrystallizados em methanol-agua; resultando 8,4 gs. com p. f. 195-200°. Tornou-se a recrystallizar com alcool absoluto; ether absoluto; ether de petroleo: p. f. 197-202°.

Dissolveu-se novamente em acetona (mais ou menos 300 cc.) e fez-se passar por uma columna estreita de oxydo de aluminio (Brockmann). Depois da eluição com chloroformio surgiu novamente um estreito annel sujo na superficie, enquanto a columna permaneceu incolor e o filtrado muito ligeiramente amarellado. O residuo secco do filtrado foi dissolvido em 200 cc. de alcool quente e despejado em mais ou menos 700 cc. de agua quente. Durante a noite, na geladeira, crystallizaram 4,80 gs. de agulhas quasi incolores do p. f. 203-205°. Ellas foram novamente recrystallizadas e deram 4,17 gs. de crystaes com o p. f. 204-209°.

Dissolveu-se, então, em 200 cc. de acetona e fez-se atravessar um filtro coberto com uma camada de 2 cm. de oxydo de aluminio (Brockmann), lavando-se em seguida com 50 cc. de acetona. Na superficie surgiu uma estreita camada pardacenta. O filtrado incolor foi aquecido e introduzido, sob agitação, em 700 cc. de agua, previamente aquecida a 52°. Immediatamente iniciou-se a formação de pequenas agulhas brancas. Depois de uma noite na geladeira, procedeu-se á aspiração: obteve-se 3,61 gs. de crystaes de p. f. 205,5-208,5°, o qual permaneceu constante, mesmo após repetidas recrystallizações.

Para a determinação da rotação optica dissolveu-se 0,9327 gs. de substancia em 50 cc. de chloroformio, medindo-se a rotação em um tubo de 20 cm..

$$\alpha = +0{,}347^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = \frac{+\,0{,}347 \times 100}{20 \times 1{,}8654} = +9{,}30^\circ$$

Analyses

5,071 mgs. subst. perderam no a. v. a 100° 0,031 mgs.
5,078 mgs. " " " " " a 100° 0,029 mgs.

5,040 mgs. subst. : 13,060 mgs. CO_2 : 3,620 mgs. H_2O
5,049 mgs. " : 13,130 mgs. CO_2 : 3,740 mgs. H_2O

Achado:	C	70,67%	H	8,04%
		70,92%		8,29%
Media:		70,79%		8,16%
Calculado:				
$C_{27}H_{36}O_6$		71,01%		7,95%
$C_{27}H_{38}O_6$		70,78%		8,36%

2. *Titulação do grupo lactonico*

106,1 mgs. de *marino*-bufagina foram dissolvidos em 30 cc. alcool absolut. deixando-se repousar durante a noite com 500 cc. de soluto de soda caustica N/10. Em seguida, titulou-se o excesso, simultaneamente com uma prova em branco, com acido chlorhydrico N/10.

Sol. de soda caustica N/10 gasta: 2.22 cc.
Peso equivalente achado: 478
" " calculado para $C_{27}H_{36}O_6$: 456

3. *Acetato de* marino-*bufagina.*

O acetato foi preparado como de costume e purificado por recrystallização com methanol-agua. Seu p. f. oscillava entre 225-230°.

4,899 mgs. subst. perderam no a. v. a 100° 0,018 mgs.
4,881 mgs. " : 12,610 mgs. CO_2 3,450 mgs. H_2O

Achado:	C	70,46%	H	7,91%
Calculado:				
$C_{29}H_{38}O_7$		69,88%		7,63%
$C_{29}H_{40}O_7$		69,60%		8,00%

4. *Preparação da dehydro-bufotenina.*

O residuo da extracção de chloroformio (vide 1) repousou durante 10 dias em 2 litros de methanol, sendo depois decantado, addicionando-se novamente ao residuo 2 litros de methanol, deixando-se repousar mais uma vez durante 14 dias á temperatura ambiente.

Os extractos de methanol reunidos foram completamente seccados no vacuo á temperatura ambiente. O residuo resinoso pardacento foi dissolvido em cerca

de 150 cc. de alcool absoluto e misturado com cerca de 1 litro de chloroformio sob forte agitação. Depois de decantado, o residuo foi novamente tratado com um pouco de alcool-chloroformio.

Os componentes insoluveis em alcool-chloroformio foram dissolvidos em agua e tratados com ether durante varias horas no apparelho, afim de extrahir o acido suberylico. Alcalinizou-se, então, o soluto aquoso com hydroxydo de baryo e extrahiu-se com ether, no respectivo apparelho, a bufotenina acaso nelle contida. O soluto etherico, no entanto, só deixou pequena quantidade de residuo.

Depois de afastados, por aquecimento, os solventes volateis do soluto aquoso, acidulou-se ligeiramente com acido sulfurico e aspirou-se o sulfato de baryo. Addicionou-se ao filtrado, a quente, um soluto de 6 gs. de acido picrico em 500 cc. de agua. Occorreu immediatamente uma precipitação, que se aspirou, surgindo uma nova quantidade de precipitado, depois de repouso na geladeira, durante uma noite. Estas duas porções foram recrystallizadas em alcool-agua. Ellas se distinguiam um pouco pela côr, enquanto o seu p. f. de 189° era o mesmo para ambas. Com o fito de purificação, recrystallizou-se ainda varias vezes com methanol-agua, até as duas porções obterem a mesma forma crystallina e a mesma cor. O rendimento foi de 6,09 gs. e o p. f. 188,5-189°. No a v. a 100° nenhuma perda de peso.

5,000 mgs. subst.: 8,835 mgs. CO_2; 1,920 mgs. H_2O; 0,015 mgs. residuo
3,017 mgs. " : 0,416 cc. N_2. 28,5°, 748 mm.
2,569 mgs. " : 0,356 cc. N_2. 27,0°, 749 mm.

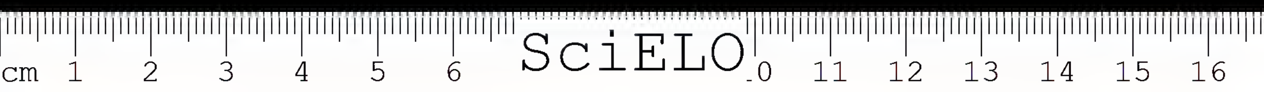
Achado:	C 48,34%	H 4,31%	N 15,35%
			N 15,53%
Calculado:			
$C_{12}H_{14}ON_2.C_6H_3O_7N_3.H_2O$	48,12%	4,23%	15,58%

5. *Transformação do picrato.*

Cobrindo-se o picrato amarello com acido chlorhydrico alcoolico, este toma instantaneamente uma cor vermelha viva. Aspira-se, então, o picrato, assim obtido, e lava-se com um soluto de alcool e acido chlorhydrico. O ponto de fusão e o ponto de fusão de mistura dos dois picratos é 188,5°.

6. *Preparação do flavianato da dehydro-bufotenina.*

Agitou-se 1 g. de picrato com 4 cc. de acido sulfurico diluido mais 16 cc. de agua e ether, diluiu-se novamente com agua e extrahiu-se no apparelho com ether. Concentrou-se o soluto aquoso no vacuo e precipitou-se com acido fla-



vianico. No dia seguinte, filtrou-se o residuo vermelho-sujo por aspiração, dissolveu-se quente em alcali fraco, fazendo-se passar uma corrente de nitrogenio, e acidulou-se, então, com acido sulfurico. O residuo vermelho vivo foi separado por aspiração e lavado com agua. Decompôs-se numa temperatura superior a 250°.

3,111 mgs. subst. perderam no a. v. a 100° 0,002 mgs.
11,272 " " " " " " " " 0,140 mgs.
3,109 " " : 0,288 cc. N_2. 26°. 749 mm.
11.132 " " : 5.124 mgs. $BaSO_4$.

Achado:	N 10,42%	S 6.32%
Calculado:		
$C_{12}H_{14}ON_2 . C_{10}H_6O_8N_2S$	10.86%	6.21%

7. *Preparação do hydrochloreto da dehydro-bufotenina.*

Cobriu-se com 1 g. de picrato com 15 cc. de acido chlorhydrico alcoolico (com o que se deu a transformação em picrato vermelho) e pôs-se a ferver. Depois de esfriado precipitou-se com ether. Aspirou-se depois de algum tempo a mistura do picrato vermelho e hydrochloreto, repetindo-se o mesmo tratamento acima descripto. Puseram-se, então, a ferver os crystaes com alcool e carbono activo, filtrou-se e precipitou-se o filtrado com ether. Desse modo se obtiveram laminas quadradas brancas num rendimento de 61% do theorico. Na micro-determinação do ponto de fusão verificou-se o desprendimento de agua a uma temperatura de cerca de 130°, fundindo-se a substancia nitidamente a uma temperatura de 247° sob forte decomposição.

RESUMO

Depois de uma introducção sobre os componentes dos venenos de sapo em geral, vem descripto o processo de preparação e purificação cuidadosa da bufagina do veneno do *Bufo marinus*. As qualidades da substancia assim obtida são comparadas com os dados de auctores mais antigos, discutindo-se a possivel formula de sua constituição chimica, de accordo com os dados mais seguros sobre a *vulgaro*-bufagina e confirmados por analyses muito exactas; da fracção do veneno de *Bufo marinus*, contendo as bases, insulou-se uma base sob a forma de diversos saes, cujas analyses unanimemente indicam a formula $C_{12}H_{14}ON_2$ para a propria base. Esta é reconhecida como dehydro-bufotenina.

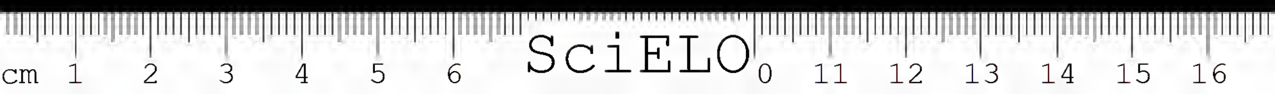
ZUSAMMENFASSUNG.

Nach einer Einfuehrung ueber die Inhaltsstoffe der Kroetengifte im Allgemeinen wird die Darstellung und sorgfaeltige Reinigung des Bufagins aus *Bufo marinus*-Gift beschrieben. Die Eigenschaften der so erhaltenen Substanz werden mit den Angaben aelterer Autoren verglichen und eine neue Konstitutionsformel diskutiert, die sich an die weitgehend gesicherte Formel des *vulgaro*-Bufagins anlehnt und durch sehr gut stimmende Analysen gestuetzt wird. — Aus der die Basen enthaltenden Fraktion des Giftes von *Bufo marinus* wurde eine Base in Form verschiedener Salze isoliert, deren Analysen eindeutig auf die Formel $C_{12}H_{14}ON_2$ fuer die Base selbst hinweisen. Sie wird als Dehydro-Bufotenin erkannt.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Abel, J. & Macht, D.* — J.Pharm.Exper.Therap. 3:319.1912.
2. a) *Wieland, H.* — S.B.Bayr.Akad.Wiss. :329.1920.
   b) *Wieland, H. & Alles, R.* — Ber.dtsch chem.Ges. 55:1789.1922
   c) *Wieland, H.; Hesse, G. & Mittasch, H.* — Ber.dtsch.chem.Ges. 64:2099.1931.
   d) *Wieland, H.; Hesse, G. & Meyer, H.* — Liebig's Ann.Chem. 498:272.1932.
   e) *Wieland, H.; Konz, W & Mittasch, H* — Liebig's Ann.Chem. 513:1.1934
   f) *Wieland, H. & Hesse, G.* — Liebig's Ann.Chem. 517:22.1935.
   g) *Wieland H.; Hesse, G. & Huettel, R.* — Liebig's Ann.Chem. 524:208.1936.
3. a) *Jensen, H. & Chen, K. K.* — J.Biol.Chem 87:755.1930.
   b) *Jensen, H. & Evans, E.* — J.Biol.Chem. 104:307.1934.
4. *Jensen, H. & Chen, K. K.* — J.Biol.Chem. 116:87.1936.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

612.3141:615.94:597.8

ESTUDOS SOBRE OS VENENOS DE SAPOS BRASILEIROS

2. Sobre a adrenalina no veneno de *Bufo marinus*

POR

C. H. SLOTTA; J. R. VALLE & C. NEISSER

Em 1912 Abel e Macht (1), nos Estados Unidos, conseguiram isolar duas substancias crystallinas da secreção das glandulas parotoides do sapo *Bufo marinus*. A analyse chimico-pharmacologica minuciosa de uma das substancias demonstrou tratar-se de adrenalina, base que até então sómente tinha sido encontrada como materia endocrinica activa na medulla suprarenal.

Tendo a existencia de tal hormonio na secreção toxica do sapo já chamado a attenção, maior surpresa causou a relativamente alta porcentagem de adrenalina nella registada por Abel e Macht. Estes affirmavam terem obtido de 5,42 gs. de veneno 0,243 gs. de adrenalina crystallizada, pesados uma hora depois de sua extracção, o que corresponde a 4,5%. Presumindo-se que o veneno continha agua, e que durante sua elaboração certamente se tenha perdido 1/3 da adrenalina, pode-se contudo ainda contar com pelo menos 7% de adrenalina no veneno natural. Para fins comparativos, Abel e Macht mencionaram que a glandula suprarenal do boi contem 0,3% de adrenalina.

Durante muitos annos, este resultado se manteve de pé, embora ninguem o confirmasse. Jensen e Chen, que nos ultimos dez annos se dedicaram ao estudo da secreção toxica das mais variadas especies de sapo, examinaram-na, afim de verificar a presença de adrenalina. Já em 1923, Novaro (2), baseando-se nos effeitos physiologicos, indicava a provavel existencia de adrenalina no veneno do sapo sul-africano *Bufo regularis*. Mais tarde, essa supposição foi apoiada por Chen e Chen (3), que calculavam em 4,6% a adrenalina contida nessa secreção, guiando-se pelo methodo da pressão arterial. Em 1935, Jensen (4) conseguiu insular 0,3% de adrenalina desta secreção do sapo, porcentagem esta

que está em completa contradicção com o enorme teor, calculado segundo pesquisas physiologicas.

Já ha mais tempo, Jensen e Chen (5) conseguiram insular 0,2% de adrenalina, em estado bruto, da secreção secca do sapo chinez, commumente designado com o nome de Ch' an Su. Depois Jensen (4) insulou adrenalina num teor de 0,4% do veneno do *Bufo arenarum* (sapo argentino), resultado este, independente e simultaneamente obtido pelo pesquisador argentino Deulofeu (6). Enquanto que grande quantidade de adrenalina foi obtida do veneno de *Bufo marinus*, apenas se conseguiram obter pequenas quantidades da secreção do sapo chinez, sul-africano e argentino, e em duas especies (7) foi a sua presença apenas admittida, guiando-se pela reacção physiologica e chimica.

Já que tinhamos á nossa disposição abundante material de veneno do *Bufo marinus*, pareceu-nos interessante submetter o resultado obtido, ha 25 annos, por Abel e Macht a uma nova verificação, uma vez que os resultados citados, nos ultimos annos, já careciam de confirmação. Com o veneno preparámos primeiramente uma emulsão aquosa e procedemos ao exame sobre a sua acção vasoconstrictora, segundo methodo de Loewen-Trendelenburg.

Já qualitativamente obtivemos um effeito muito pronunciado. Procurando avaliar esse effeito segundo sua ordem de grandeza, preparamos solutos de veneno em concentrações variadas, e comparámos o effeito vaso-constrictor, assim obtido, com o effeito de um soluto padrão de adrenalina pura (1:300.000). Como explicaremos mais pormenorizadamente na parte experimental, observámos que o veneno do *Bufo marinus*, em vista de seu effeito vaso-constrictor, parece conter *menos de 2% de adrenalina.*

Algumas reacções chimicas do veneno natural indicavam tambem a existencia de uma substancia, que chimicamente se assemelha á adrenalina. Assim observámos, por exemplo, que solutos ligeiramente alcalinos do veneno, expostos ao ar e á luz, se coravam em pouco tempo em rosa. A reacção com chloreto de ferro, bastante caracteristica, si bem que não especifica para a adrenalina, era positiva: com solutos acidos obtinha-se uma coloração verde; e vermelha escura em meio alcalino.

Baseando-nos nessas experiencias preliminares, dispuzemo-nos a separar do veneno de sapo a adrenalina em estado crystallino. Nossos primeiros ensaios tiveram resultados negativos, os quaes, segundo hoje sabemos, foram motivados pela elaboração pouco rapida e sob condições menos cuidadosas. A adrenalina caracteriza-se por uma extrema sensibilidade com relação á luz e ao ar, especialmente em solutos alcalinos. Ficou provada a necessidade premente de executarmos essa tarefa tanto quanto possivel numa atmosphera do mais puro nitrogenio. No principio, procedémos do seguinte modo: depois da extracção completa do veneno de sapo pelo chloroformio e ether, foi o mesmo triturado num grande volu-

me de agua e centrifugadas as substancias mucoides precipitadas. Este soluto foi libertado de albumina e outros elementos basicos por precipitação com sal de chumbo, e o chumbo removido do soluto filtrado pelo hydrogenio sulfurado. Passou-se então a concentral-o no vacuo, agitando novamente o soluto com dissolventes de lipoides e, finalmente, concentrando-o fortemente. Com a addição de ammoniaco á solução concentrada assim obtida, e na geladeira a adrenalina crystallizou, sendo recrystallizada varias vezes com o fito de maior purificação.

De 4 gs. de veneno secco obtivemos 54 mgs. de adrenalina recrystallizada, quantidade esta correspondente a 1.35%. Uma vez que a nossa elaboração foi a mais cuidadosa e rapida possivel, estamos certos de que as nossas perdas em adrenalina foram muito insignificantes. Achamo-nos, pois, no direito de *affirmar que na secreção secca do sapo* **Bufo marinus** *de nenhum modo existe mais do que 2% de adrenalina.*

Está excluida qualquer duvida sobre a uniformidade e a pureza do nosso preparado, assim como sobre sua identidade com a adrenalina: ponto de fusão, rotação optica e actividade physiologica concordam perfeitamente com os dados da literatura.

Ainda que, de um lado, não possamos confirmar a quantidade tão elevada de adrenalina indicada por Abel e Macht, de outro lado verificámos ser o teor de adrenalina no *Bufo marinus* bem maior que o encontrado nas secreções toxicas das demais especies de sapo. Não ha, pois, duvida alguma de que o sapo *Bufo marinus* constitue neste caso uma excepção.

Mais difficil é, no entanto, explicar a divergencia entre os nossos resultados e os de Abel e Macht. Estes escrevem que em outras experiencias obtiveram menores quantidades de adrenalina e que creem poder tirar dahi a conclusão de que "a porcentagem da adrenalina varia com a estação e as circunstancias". Representando, pois, os resultados por nós obtidos nas pesquisas de veneno uma media em varios milhares de sapo, extrahidos em diversas estações do anno, achamo-nos no direito de dar mais credito á porcentagem de 2% de adrenalina no veneno de sapo, por nós verificado, que aos teores tão elevados de Abel e Macht.

Achamos, pois, que os nossos resultados merecem toda a confiança, já que entre as experiencias chimicas e physiologicas, procedidas uma independentemente da outra, existe uma perfeita concordancia, enquanto que, nas demais especies de veneno, apenas se pode isolar uma fracção do principio vaso-constrictor provado por via physiologica.

É sabido que no veneno do *Bufo marinus* existe mais uma base que pudemos reconhecer como sendo a dehydro-bufotenina. Tambem nos venenos de outras especies de sapos, existem bases semelhantes, que se distinguem em geral da dehydro-bufotenina, á semelhança da adrenalina, pelo seu effeito vaso-cons-

trictor. A presença dessas bases pode ser o motivo pelo qual nas experiencias physiologicas se encontra mais principio vaso-constrictor do que a quantidade de adrenalina chimicamente isolada.

Descripção das experiencias

6,4 gs. de veneno secco foram completamente extrahidos num extractor Soxhlet primeiramente com chloroformio e depois com ether, operação esta que durou tres horas. O veneno natural assim extrahido foi bem triturado com mais ou menos 350 cc. de agua, e centrifugada a solução turva. O precipitado foi varias vezes lavado com agua e esta mesma agua depois novamente juntada ao soluto principal. Dahi por diante todas as operações foram executadas numa atmosphera do mais puro nitrogenio.

Addicionou-se acetato de chumbo até não mais surgir precipitado, filtrando-se em seguida e deixando-se passar uma forte corrente de hydrogenio sulfurado pelo filtrado. Lavado convenientemente o sulfureto de chumbo filtrado, o soluto foi concentrado no vacuo até mais ou menos 100 cc., agitando-se em seguida varias vezes com uma mistura de ether-chloroformio a 1,4. O volume do soluto aquoso foi reduzido a 15 cc. e depois dividido em tres partes iguaes, as quaes foram guardadas sob uma camada de ether de petroleo e sob uma atmosphera de nitrogenio.

Uma vez que ensaios de uma das partes do soluto deram resultados positivos, addicionou-se ammoniaco concentrado ás duas outras partes até reacção alcalina. Depois de deixar repousar dois dias na geladeira filtrou-se por aspiração: os crystaes foram lavados em agua e ligeiramente seccados no deseccador. Dissolveu-se a seguir em um soluto bem diluido de acido acetico, filtrou-se e addicionou-se ammoniaco concentrado sob uma camada de ether de petroleo numa atmosphera de nitrogenio. Observou-se quasi que instantaneamente a formação de crystaes na geladeira. Filtrou-se no dia seguinte, lavou-se com agua, alcool e ether e deixou-se seccar no deseccador:

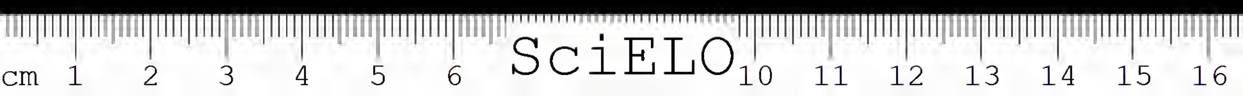
Quantidade obtida: 53,6 mgs.

Ponto de fusão: 208-212°

Do mesmo modo procedeu-se á recrystallização. O ponto de fusão ficou desta vez entre 211-213° sob decomposição.

Para determinação do poder rotatorio dissolveram-se 11,3 mgs. em 1 cc de agua, na qual previamente tinham sido dissolvidos um pouco de acido acetico e um grãozinho de sulfito de sodio.

$$\alpha = -0{,}29^\circ ;\ [\alpha]^{20}_{D} = \frac{-29}{0.5 \times 1.13} = -51.3^\circ$$



Ensaio physiologico

a) *Methodo.*

O effeito vaso-constrictor do veneno do *Bufo marinus* é bem conhecido, e o estudo das propriedades sympathico-mimeticas da substancia tem sido realizado por differentes auctores. Empregando a conhecida preparação de Loewen-Trendelenburg, de perfusão do trem posterior da rã, inicialmente procurámos determinar a intensidade vaso-constrictora de solutos do veneno natural como si contivessem 2 e 5% de adrenalina, acertada a diluição a 1 por 300.000.

Utilizamos exemplares medios de *Leptodactylus occellatus*. A canula de perfusão introduzida na aorta abdominal era ligada por um tubo de vidro em Y e dois tubos de borracha a dois vasos de Mariotte de pressão constante: um continha soluto physiologico de Clark e o outro, a diluição do veneno feita em Clark, filtrada e com pH = 7,2 — 7,6. O debito da preparação, expresso em gottas do liquido perfuso a sahirem pela veia abdominal anterior, era registado electricamente, graças ao emprego de uma chave interruptora particular e de um signal electromagnetico de Deprez. Com a inscripção concomitante do debito e do tempo no papel enfumaçado de um cymographo obtivemos traçados que permittiram, tanto a contagem do numero de gottas por minuto, no decurso da experiencia, como a confecção das curvas do graphico annexo.

b) *Resultados.*

Fizemos inicialmente a determinação do effeito vaso-constrictor de um soluto a 1 por 150.000 da Suprarenina Bayer, levando em conta a sua actividade como producto synthetico racemico duas vezes menos activo do que o producto levogyro. O resultado foi tomado como padrão do effeito vaso-constrictor de uma solução de adrenalina natural a 1 por 300.000. Com esta solução o debito cahiu, no segundo minuto de perfusão, de 22 para 1 gotta por minuto (Graphico B.) ou de 111 gottas em 5 minutos de perfusão com liquido de Clark para 13 nos primeiros 5 minutos após o inicio da perfusão com a suprarenina (11,7%).

1 — *Experiencias com o veneno natural.*

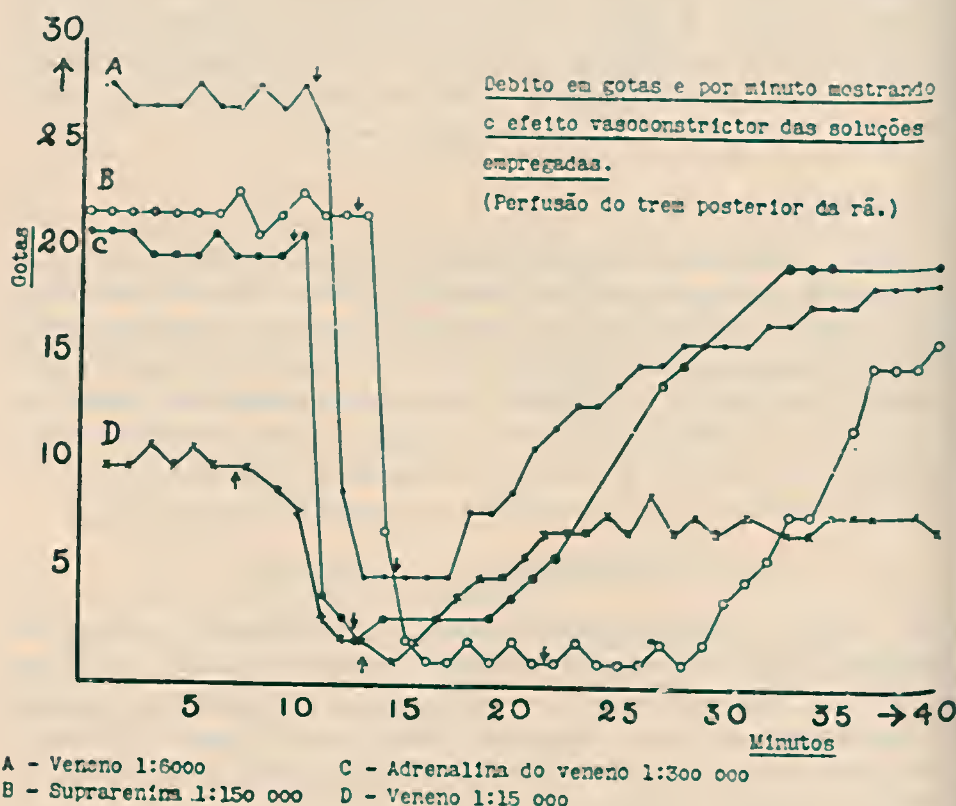
a) Soluto a 1:6000 de veneno natural. Correspondente á diluição de 1:300.000 de adrenalina natural, si contivesse 2% dessa substancia. O effeito vaso-constrictor pode ser apreciado no graphico A. O debito cahiu, no segundo minuto de perfusão, de 28 para 5 gottas por minuto ou de 137 gottas em 5 minutos de perfusão com Clark para 25, nos primeiros 5 minutos após o inicio da perfusão com o veneno (18,2%).

b) Soluto a 1:15.000 do veneno natural. Este soluto, si o veneno contivesse 5% de adrenalina natural, corresponderia á diluição de 1 por 300.000. O effeito vaso-constrictor pode ser apreciado na curva D. O debito cahiu de 10 para 3 gottas, no segundo minuto de perfusão. Considerando 5 minutos antes e após a perfusão com o veneno, temos a relação 49 para 10 ou 20%.

2 — *Experiencia com a adrenalina retirada do veneno.*

Os ensaios foram feitos nas mesmas condições, empregando-se a diluição a 1 por 300.000. O effeito vaso-constrictor pode ser apreciado no graphico C. O debito cahiu de 20 para 3 gottas no segundo minuto de perfusão. Considerando 5 minutos antes e após o inicio da perfusão temos 100:12 ou 12%.

Nestas condições, temos que a queda do debito de perfusão por cento foi practicamente a mesma com a Suprarenina e com a adrenalina retirada do veneno do *Bufo marinus*. Tambem os ensaios com o veneno natural mostraram que não contêm nem 2% da substancia activa.



RESUMO

Um pequeno resumo de toda a literatura sobre o teor em adrenalina no veneno de sapos mostrou que existem quasi sempre grandes divergencias entre as verificações physiologicas e os dados da separação chimica. Especialmente, o alto teor em adrenalina por muitos auctores registados no veneno do *Bufo marinus* requeria, á vista da literatura moderna, uma verificação.

Esta acaba de ser executada por meio de intima collaboração do trabalho physiologico com a determinação chimica, tendo provado, consistentemente que, no veneno do *Bufo marinus*, não se encontra mais de 2% de adrenalina. O ensaio physiologico chegou a esse resultado por meio da avaliação quantitativa da vaso-constricção feita pela prova de Loewen-Trendelenburg. A separação chimica, feita sob as mais escrupulosas precauções, deu um teor de 1,35% de adrenalina, de modo que, incluindo as perdas certamente insignificantes, de maneira alguma se poderá calcular um teor superior a 2%.

ZUSAMMENFASSUNG.

Eine kurze Zusammenfassung der gesamten Literatur ueber den Adrenalingehalt der Kroetengifte ergab, dass zwischen physiologischem Nachweis und chemischer Isolierung fast stets grosse Unstimmigkeiten bestehen. Insbesondere bedurfte der von den aeltesten Autoren im Gifte von *Bufo marinus* gefundene, sehr hohe Adrenalingehalt im Lichte der neueren Literatur einer Nachpruefung.

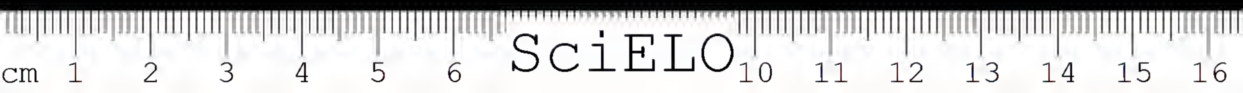
Diese wurde in enger Zusammenarbeit zwischen Physiologen und Chemiker durchgefuehrt und ergab eindeutig, dass im Gifte von *Bufo marinus* keinesfalls mehr als 2% Adrenalin enthalten sind. Die physiologische Pruefung kam zu diesen Resultat durch quantitative Auswertung der im Loewen-Trendelenburg-Test gemessenen Vasokonstriktion. Die chemische Isolierung unter allen Vorsichtsmassregeln ergab einen Gehalt von 1,35% Adrenalin, sodass unter Einrechnung der sicherlich geringfuegigen Verluste keinesfalls mit einem hoeheren Gehalt als 2% gerechnet werden kann.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Abel, J. J. & Macht, D. I.* — J.Pharm.&Exp.Therap. 3:319.1912.
2. *Novaro, V.* — C.R.Soc.Biol. 88:371.1923.
3. *Chen, K. K. & Chen, A. L.* — J.Pharm.&Exp.Therap. 49:503.1933.

4. *Jensen, H.* — J.Am.Chem.Soc. **57**:1765.1935.
5. *Jensen, H. & Chen, K. K.* — J.Biol.Chem. **82**:397.1929.
6. *Deulofeu, V.* — Ztschr.Physiol.Chem. **237**:171.1935.
7. *Chen, K. K. & Chen, A. L.* — Arch.intern.Pharmacodyn.Therap. **97**:297.1934.

(Trabalho das Secções de Chimica e Pharmacologia Experimentaes e de Physio-pathologia do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).



612.31412:615.94:598.122

ESTUDOS CHIMICOS SOBRE OS VENENOS OPHIDICOS

I. Determinação de sua toxicidade em camondongos

POR

C. H. SLOTTA & G. SZYSZKA

No estudo do effeito toxico de venenos ophidicos e no exame do poder neutralizante de nossos soros ophidicos vêm-se, ha muitos annos, empregando, no Instituto Butantan, exclusivamente pombos adultos, como animaes de experiencia (1, 2, 3.). Em si representa o pombo o animal ideal para as determinações de teor da toxicidade, pois além de não estar sujeito ás influencias de factores externos, como temperatura ou estações do anno, é extremamente sensivel ao veneno ophidico, de modo que com facilidade se obtem um limite de erro inferior a 10%. Visto que, para a immunização de cavallos, o teor de toxicidade de cada veneno e, para a applicação clinica, o poder de neutralização de cada sôro têm que ser determinados com muita exactidão, não ha duvida que para essas experiencias, nas quaes apenas se necessita de alguns animaes, o pombo continuará sendo o animal de experiencia mais adequado.

No entanto, quando ha um anno começámos com as nossas experiencias sobre o veneno ophidico, usando especialmente a peçonha de *Crotalus t. terrificus*, pareceu-nos logo que, em trabalhos puramente chimicos, teriamos que renunciar ao emprego de pombos para a determinação do teor da toxicidade dos nossos solutos. Em taes pesquisas, para se poder determinar um enriquecimento em substancia toxica, isto é, o grau de purificação do principio activo e exprimil-a em algarismos, o unico recurso consiste em determinar-se sobre animaes o teor

de toxicidade de um soluto ou de uma substancia. Como, naquella occasião, ainda não se sabia bem a que classe de corpos chimicos pertenciam os principios activos do veneno ophidico, tinhamos que lançar mão de methodos que facilitassem a pesquisa desses venenos. Considerando que até então não se dispunha de nenhum dado definitivo, resultante de ensaios feitos para insular a toxina de cobras, pareceu-nos de antemão impossivel obter o numero necessario ás innumeras inoculações a serem feitas. Além disso, tinhamos que esclarecer primeiramente a influencia de varios factores, como temperatura, luz, acidez e concentração de saes sobre solutos de venenos ophidicos; tinhamos, igualmente, que obter uma idéa clara da influencia da seccagem sobre o veneno, etc.. Para esse fim, necessitavamos de numero consideravel de animaes, para termos pelo menos uma idéa geral da sensibilidade do veneno ophidico ás influencias chimicas e physicas: para isso, em certa occasião, tivemos que gastar 1.200 animaes durante 3 meses. Nessas provas, não exigiamos uma exactidão além de 5%, mas sim a possibilidade de realizar, em grande escala, experiencias nas quaes os diversos problemas pudessem ser examinados sob os mais diversos pontos de vista. Os animaes de experiencia em qualquer quantidade têm que ser facilmente obtidos, e isso a um preço modico; um limite de erros de 10-15% é perfeitamente admissivel para o fim a que se destina. Por enquanto, não se podem dispensar as experiencias em animaes, visto que ainda não se conhece nenhuma reacção chimica caracteristica, que forneça dados quantitativos capazes de indicar qualquer enriquecimento ou concentração obtida na substancia ou fracção toxica do veneno ophidico.

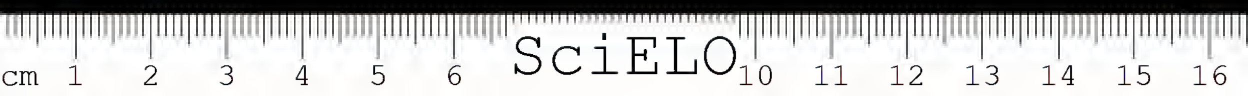
O animal de experiencia, que corresponde a todas estas exigencias, é o camondongo. Antigamente era bastante difficil o emprego de camondongos para experiencias, visto que eram muito raros e difficeis de criar em S. Paulo. Felizmente, o serviço zootechnico da Secção Agricola do Instituto Butantan conseguiu superar essas difficuldades, dispondo a qualquer hora de um numero sufficiente desses animaes.

Uma vez que esses animaes recebam um alimento uniforme e rico em vitaminas (mingau de pão branco, leite com um pouco de oleo de figado) e cavaquinhos de madeira de cedro (com cavaquinhos de outras especies de madeira, contendo certos tanninos e principios amargos, elles morrem depressa) e sejam mantidos, com a maxima limpeza, em gaiolas de zinco com tampa de tela de arame, e numa temperatura constante de 23-24°, conseguem-se criar e dispôr

delles para experiencias, mesmo num clima tão inconstante e humido como o de S. Paulo. A proposito, observamos que especialmente a temperatura em que são mantidos os animaes de experiencia exerce uma influencia decisiva sobre as provas, a ponto de, nos dias frios, a dose mortal minima ser maior. Devem-se, portanto, manter os camondongos em um bioterio aquecido a electricidade a uma temperatura de 23-24°, onde permanecem pelo menos durante um dia antes da experiencia. Considerando que o peso do animal desempenha um papel importante, tomamos desde o principio como base de nossas unidades o g. de animal.

Animaes utilizados: devem ter em regra o peso de 15 gs., não se mantendo mais de 8 juntos nas gaiolas acima mencionadas. Não se faz differença alguma entre femea e macho, visto que não se poude observar qualquer divergencia proveniente da differença de sexo. Excluimos apenas as femeas já prenhes ou que acabavam de ter cria, visto que estas demonstravam ser menos sensiveis ao veneno ophidico. A classe de pesos de 15 gs. compõe-se apenas de animaes jovens.

Solutos: os diversos venenos ophidicos para a determinação do teor de toxicidade devem ser preparados do seguinte modo: 50 mgs. de uma peçonha secca são dissolvidos, cuidadosamente e sem agitar muito, em um balão volumetrico de 250 cc. em um pouco de soluto physiologico, afim de evitar muita formação de espuma do soluto proteinico; em geral basta cobrir a substancia toxica com fina camada de soluto de chloreto de sodio, deixando repousar por algum tempo. Justamente na preparação dos solutos do veneno de *Crotalus* obtivemos bons resultados com a technica aconselhada por Brazil (4), a qual consiste na dissolução previa do veneno em um soluto mais concentrado de chloreto de sodio, de modo que, depois de completado o volume até á marca com agua destillada, resultassem 250 cc. de soluto physiologico no balão. A esses solutos addicionava-se 1/5 do volume total de liquido existente no balão volumetrico: geralmente 50 cc. na preparação de 250 cc.. Pela addição do soluto saturado de Nipagina, que por litro continha 1,5 gs. de substancia, conseguimos, nas experiencias permanentes, que as soluções, mesmo depois de permanecerem meses na estufa, continuassem completamente livres de cultura de bacterias: nas primeiras experiencias, porém, feitas sem essa precaução luctamos com difficuldades dahi provenientes. Esses solutos base eram então diluidos com sôro phy-



siologico, a tal ponto que se injectava 0,1 cc. até no maximo de 0,5 cc. por camondongo.

Injecção: os solutos toxicos devem ser administrados aos camondongos nas concentrações indicadas, em duas partes iguaes, por via subcutanea, acima dos omoplatas direito e esquerdo. Temos sempre o especial cuidado de sempre empregar a mesma technica nas injecções: estas são feitas pela manhã, antes da refeição que se dá, ao meio dia, aos animaes, ou algumas horas mais tarde. Os animaes são marcados por um systema determinado e levados novamente para o bioterio aquecido; por ser mais commodo, demos sempre as injecções no proprio laboratorio. Seguindo-se as mesmas normas, obtêm-se sempre os mesmos resultados, na repetição dos ensaios com os mesmos solutos. Assim pode ser facilmente alcançado um limite de erros de 10-15%, o qual é mais do que sufficiente para os nossos fins na chimica.

Enquanto estavamos ainda occupados com as pesquisas de determinação do teor de toxicidade nos camondongos, appareceram dois trabalhos sobre veneno ophidico, feitos nos laboratorios de dois pesquisadores de chimica, mundialmente conhecidos. Até agora, apenas medicos e biologos se haviam dedicado ao estudo dos venenos ophidicos, de sorte que quasi todas as suas indicações sobre composição chimica apresentavam erros mais ou menos graves; por isso, as novas pesquisas, tanto de F. Micheel e F. Jung (5), como de H. Wieland e W. Konz (6), por serem os primeiros ensaios sobre a pesquisa da constituição do veneno ophidico, têm uma importancia especial.

Parece que para a chimica pouco a pouco se approxima o tempo em que ousaremos buscar a solução da natureza dos principios toxicos e activos de estructura proteinica, que se encontram, p. ex., nos venenos de origem animal e nos hormonios de hypophyse. E' interessante que por parte, tanto de Micheel, como de Wieland, e, ainda nas provas de venenos de abelha feitas por outros auctores (7 e 8), se hajam empregado camondongos brancos, como animaes de experiencia. Micheel toma até como unidade de veneno o gramma de camondongo, o que tambem nós tinhamos considerado vantajoso; enquanto isto, Wieland emprega camondongos de pesos mais ou menos iguaes, tomando como unidade a quantidade de veneno necessario para matar um animal inteiro.

Definição do teor de toxicidade: segundo nossas experiencias, é absolutamente necessario não adoptar como base para a unidade o camondongo como indi-

viduo, mas tomar em consideração o seu peso, pois só assim se poderão obter valores comparativos dentro do limite de erros de 10-15%. Além disso, se deve fixar o tempo de avaliação, de accordo com a experiencia, em 8 a 22 horas: si se faz, de um lado, essa avaliação dentro de tempo muito reduzido, com injecções de solutos toxicos mais concentrados, os resultados se tornam incertos e maior o limite de erros; si, doutro lado, ella é feita tardiamente, os resultados são tambem incertos, pois se sabe que os camondongos, 22 horas depois da applicação da injecção, não morrem mais por effeito directo do veneno. Sómente os animaes mortos, portanto, dentro daquelle periodo devem ser computados. Como *unidade camondongo* (*UC*) denominamos aquella quantidade de veneno medida em gammas que, sob as condições acima citadas, ainda tem o poder de matar *1 g. de camondongo num espaço de 8 a 22 horas*, sendo exigido que de 3 camondongos novos dum peso medio de 15 gs., injectados com a respectiva dose (= UC × 15 gs.), pelo menos dois tenham morrido typicamente intoxicados dentro do prazo indicado. Da dose minima mortal para um gramma de camondongo calcula-se então o *teor em toxicidade* (TT), isto é, o *numero de unidades camondongo contido em 1 mg. de veneno seccado no alto vacuo a 35° C.*

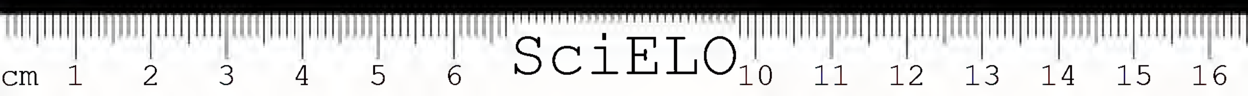
O teor da toxicidade de alguns venenos ophidicos, assim obtido, fornece a seguinte

Tabella	U. C.	secco:	T. T.
1) *Crotalus t. terrificus* (padrão)	0.45		2220
2) *Crotalus t. terrificus* (commum)	0.6	(0.52)	1920
3) *Crotalus atrox*	20.0	(17.34)	58
4) *Bothrops jararaca*	4.0	(3.6)	280
5) *Bothrops alternata*	6.0	(5.06)	200

Notas:

1) A secreção toxica do *Crotalus t. terrificus* foi extrahida no verão e immediatamente seccada no alto vacuo, ficando como residuo secco 24,9%.

2) Trata-se de uma quantidade mais elevada de veneno secco, colhida pelo Instituto no decurso dos ultimos tres annos. É, pois, um veneno medio de todas as estações do anno, de animaes de idades differentes, e, das duas variedades de *Crotalus t. terrificus* brasileiras: *collineatus* e *collirhombeatus* (9). Esse veneno continha 12,6% de agua, a qual foi expellida no alto vacuo a 35°C sobre pentoxydo



de phosphoro, durante poucas horas. O facto de Micheel (5) ter achado 38 gamma/g camondongo como D. M. L., é por elle attribuido á pouca actividade do veneno que empregou.

3) O veneno do *Crotalus atrox* foi, ha varios annos, trazido da America do Norte pelo director deste Instituto, dr. Afranio do Amaral, que nol-o offereceu para estudos. Contém 13.3% de agua, que é retirada pelo processo indicado sob numero 2).

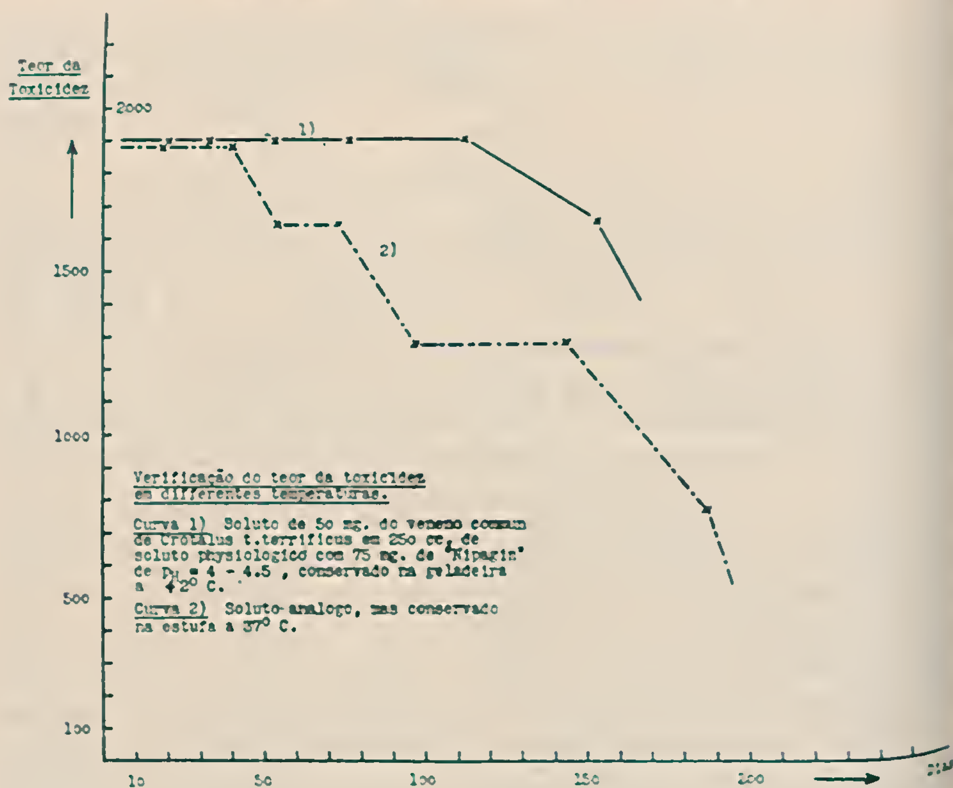
4, 5) São venenos de 2 especies communs de *Bothrops*, os quaes á semelhança do veneno do *Crotalus t. terrificus*, são extrahidos na rotina bi-semanal em nosso Instituto e seccados na estufa a 37°. O veneno do *Bothrops jararaca* continha 10.1% de agua e o do *Bothrops alternata*, 15,6%.

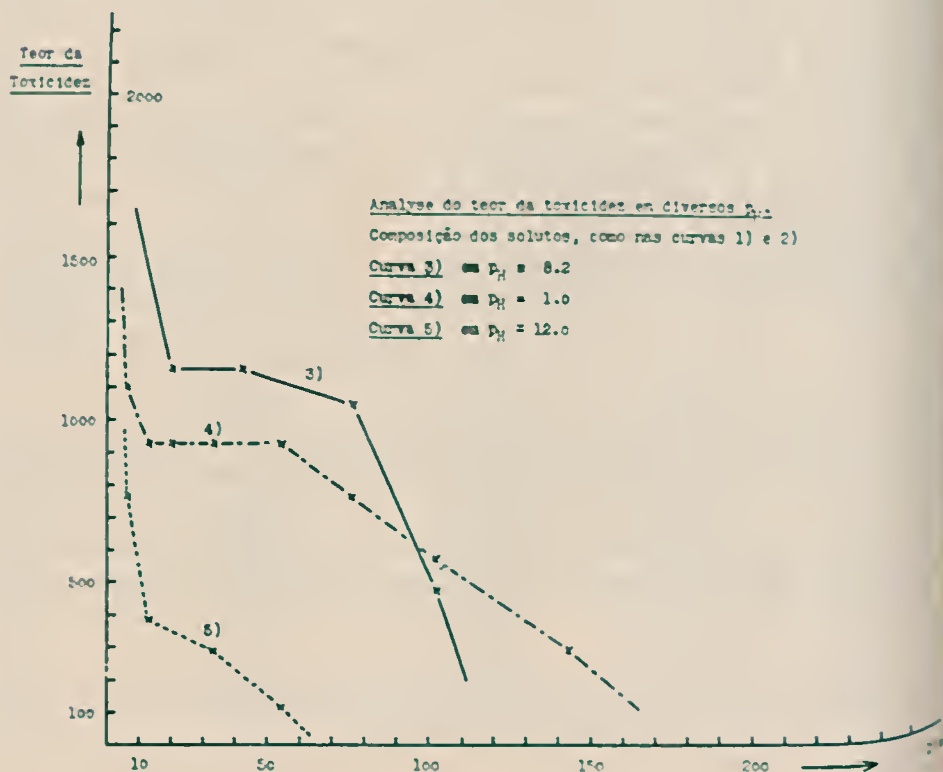
Uma vez certos de que os nossos teores de toxicidade podiam ser reproduzidos com diversos venenos, dentro de um limite de 10-15% de erro, dedicamo-nos ao estudo da conservação dos solutos da peçonha de *Crotalus t. terrificus* sob as mais diversas condições, valendo-nos do nosso methodo recem-elaborado para a determinação do teor de toxicidade. Como orientação para os demais trabalhos era para nós de especial interesse conhecer o comportamento dos solutos toxicos com relação a diversas temperaturas e a diversos graus de acidez. Os solutos de veneno, com excepção do ensaio ainda por descrever a 37°, foram sempre conservados na geladeira a uma temperatura entre 2 e 4° acima de zero, em frascos com rolhas esmerilhadas. Não expellimos o ar dos frascos por nitrogenio ou por um outro gas neutro. Os ensaios foram executados exclusivamente com o nosso veneno de *Crotalus t. terrificus* que chamamos de "medio" (vide acima No. 2) e, por commodidade, justamente com o veneno secco, tal qual o recebemos. Uma experiencia em separado mostrou que este veneno perdia, na seccagem sobre pentoxydo de phosphoro num vacuo de 0,01 mm. a 35°C, 12,6% de agua. Como contra-prova, realizámos tambem verificações do teor de toxicidade com veneno completamente secco. Estas accusaram exactamente no teor de toxicidade, um augmento correspondente á perda de agua.

O teor de toxicidade de um soluto de veneno normal, conservado livre de bacterias pela addição de Nipagin, mantem-se constante em *1920*, e mesmo depois de 112 dias. Sómente depois deste periodo é que elle começa a baixar, ficando ainda em 1640 depois de 153 dias. O soluto, mesmo depois de tres mezes, possue ainda o mesmo effeito. O seu grau em acidez oscillava durante todo o tempo, devido á presença da pequena quantidade de Nipagin fracamente acida, entre e 4,5. (Curva 1).

Soluto de 50 mgs. do veneno commum (com 12,6% de agua) de Crotalus t. terrificus em 250 cc. de soluto physiologico, com 75 mgs. de "Nipagin" a pH = 4 — 4,5, conservado na geladeira a + 2° até + 4° C.

Protocollo	Dia	Camondongo		Gamma veneno por g. animal	Gamma total	Gamma por 0,1 cc do soluto	CC.	Hora		U. C.	T. T.
		No.	Peso					da injecção	da morte		
No. 1; 4/XI/36	13.°	C 661	12.0	0.5	6.0	6.7	0.09	15^{10}			
		C 662	16.6	0.6	10.0		0.15	15^{15}	11^{00}	0,6	1920
		C 663	16.1	0.8	12.9		0.20	15^{20}	11^{06}		
		C 664	18.6	1.0	18.6		0.28	15^{20}	11^{00}		
		C 665	21.2	1.5	31.8		0.48	15^{20}	11^{00}		
No. 6; 11/II/37	112.°	C 1150	16.0	0.5	8.0	5.0	0'16	14^{40}			
		C 1151	15.8	0.6	9.5		0.19	14^{45}	16^{30}	0,6	1920
		C 1152	17.7	0.7	12.4		0.25	14^{50}	18^{00}		
		C 1153	14.8	0.8	11.8		0.24	14^{50}	18^{15}		
		C 1154	17.8	0.9	16.0		0.32	14^{50}	Enven.		
		C 1155	13.2	1.0	13.2		0.26	14^{53}	8^{00}		
No. 7; 24/III/37	153.°	C 1229	18.5	0.6	11.1	10.0	0.11	13^{15}			
		C 1230	18.0	0.7	12.6		0.13	13^{20}	8^{00}	0,7	1640
		C 1231	21.3	0.8	17.0		0 17	13^{20}	8^{00}		
		C 1232	15.1	1.0	15.1		0.15	13^{25}	8^{00}		
		C 1233	11.5	1.5	17.2		0.17	13^{30}	8^{00}		
		C 1234	11.6	2.0	23.2		0.23	13^{35}	15^{30}		
		C 1235	11.7	5.0	58.5		0.59	13^{40}	17^{00}		


Teor da Toxicidez
2000
1500
1000
500
100
1)
2)
Verificação do teor da toxicidez em differentes temperaturas.
Curva 1) Soluto de 50 mg. do veneno commum de Crotalus t.terrificus em 250 cc. de soluto physiologico com 75 mg. de "Nipagin" de pH = 4 - 4.5 , conservado na geladeira a + 2° C.
Curva 2) Soluto analogo, mas conservado na estufa a 37° C.
10
50
100
150
200


Teor da Toxicidez
2000
1500
1000
500
100
3)
4)
5)
Analyse do teor da toxicidez em diversos pH.
Composição dos solutos, como nas curvas 1) e 2)
Curva 3) em pH = 8.2
Curva 4) em pH = 1.0
Curva 5) em pH = 12.0
10
50
100
150
200

Como exemplo elucidativo da maneira pela qual obtivemos os dados do diagramma No. 1, devemos citar os protocollos do 13.°, 112.° e 153.° dias, correspondentes aos nossos Nos. 1, de 4/XI/36; 6, de 11/II/37; 7, de 24/III/37.

Conservação de um soluto de veneno a 37° (Vide diagrammas Nos. 1, 2)

Na estufa, um soluto de veneno conserva-se quasi inalterado durante muito tempo; a queda do teor de toxicidade durante grande lapso de tempo é quasi nulla, considerando-se que as DD. MM. LL. de 0,6-0,7-0,8 de veneno com um conteúdo de 12,6% de agua, correspondem a 1920, 1640 e 1430. Sómente depois de 54 dias cahe o teor de toxicidade para 1430, chegando mesmo, depois de 142 dias a um teor de 1270, o qual então desce mais rapidamente, para attingir um teor de 760, depois do 183° dia. Para examinar a *influencia do grau de acidez sobre o teor de toxicidade* (Vide diagrammas Nos. 3, 4, 5) preparamos tres solutos, analogos aos empregados nos diagrammas Nos. 1, 2, que foram levados por titulação com ammóniaco, a pH 8,2 ou pH 12 e com acido chlorhydrico a pH 1, sem tampões. Cada 15 dias procedémos á verificação do grau de acidez dos solutos, e, quando necessario, fizemos novas titulações. Ficou patenteado que, quanto mais nos afastavamos do pH natural de um soluto de veneno, que é de m.o.m. 5 (sem addição de "Nipagin") tanto para o lado acido como para o alcalino, tanto mais depressa cahia o teor de toxicidade, embora sua queda fosse mais rapida no lado alcalino. Enquanto que, depois de 2 meses, o soluto de pH = 8,2 ainda possuia mais ou menos 50 a 60% de seu teor de toxicidade, e o de pH = 1 delle possuia 40 a 50% o seu teor num soluto, levado ao pH = 12, cahiu nesse periodo a menos de 5%.

De todos esses ensaios conclue-se que o camondongo branco pode ser empregado vantajosamente como animal de controlo nas experiencias em serie e nas provas de controlo do enriquecimento de solutos de veneno, offerecendo, em comparação com os pombos, enormes vantagens em vista de sua barateza e da facilidade de serem criados. Ainda mais, o emprego de camondongos possibilita a execução de trabalhos e pesquisas, que, em vista do acima exposto, com o emprego de pombos não poderiam ser realizados, tomando-se em consideração a despesa para o numero avultado de animaes que taes ensaios exigem.

RESUMO

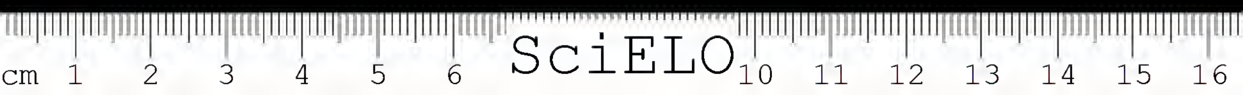
A determinação da toxicidade do veneno ophidico foi obtida com uma exactidão de 10 a 15% de erro, mediante injecção subcutanea de um soluto do veneno em camondongos. A unidade camondongo (UC.) é aquella quantidade de veneno capaz de matar 1 g. de camondongo dentro de 8 a 22 horas. O teor de toxicidade de um veneno corresponde ao numero de unidades camondogo contidas em 1 mg. do veneno seccado no alto vacuo a 35°. Assim o teor de toxicidade do veneno do *Crotalus t. terrificus* é de 2220, e o de *Bothrops jararaca* é de 280. Solutos do veneno do *Crotalus t. terrificus* podem ser conservados na geladeira durante 3 meses, sem que se lhes altere o teor de toxicidade. A 37°, o teor de toxicidade decresce consideravelmente depois de um mês e meio. Com um pH = 1, o teor de toxicidade decresce rapidamente; com um pH = 12, decresce ainda mais rapidamente; mas com um pH = 8,2, elle se conserva um pouco melhor. Solutos do veneno do *Crotalus t. terrificus* conservam-se especialmente com um pH = 4 ou pH = 5.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pruefung des Giftwertes von Schlangengift, wurde mit einer Genauigkeit von 10-15% durch subcutane Injektion der Gift-Loesung an Maeusen ausgefuehrt. Eine *Maeuse-Einheit* (ME) ist die Menge von Gift, die 1 g. Maus innerhalb von 8 bis 22 Stunden toetet. Der *Giftwert* eines Giftes ist die Zahl von Maeuse-Einheiten, die in 1 mg. des im Hochvakuum bei 35° getrockneten Giftes enthalten ist. Der Giftwert von *Crotalus t. terrificus*-Gift ist 2220, der von *Bothrops jararaca* 280. Giftloesungen von *Crotalus t. terrificus*-Gift lassen sich im Eisschrank 3 Monate ohne Aenderung des Giftwertes aufheben. Bei 37° faellt der Giftwert schon nach 1.1/2 Monaten betraechtlich ab. Bei pH = 1 sinkt der Giftwert sehr schnell, aber bei pH = 12 ganz ausserordentlich rasch. Etwas besser haltbar sind Loesungen bei pH = 8,2. Loesungen von *Crotalus t. terrificus*-Gift sind am besten bei einem pH = 4 bis pH = 5. haltbar.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Brazil, V.* — Dosagem do valor antitoxico dos sôros antipeçonhentos — Rev. Med. S. Paulo 10(22).1907.



2. *Amaral, A. do* — The Brazilian contribution towards the improvement of the specific snake-bite treatment — Proc.N.Y.Path.Soc. 23(5):92-94.1923.

3. *Amaral, A. do; Arantes, J. B. & Fonseca, F. da* — Sobre a duração da actividade das antitoxinas e antivenenos — Mem.Inst.Butantan 7:336.1932.

4. *Brazil, V.* — A defesa contra o Ophidismo :60—(Pocai & Cia.,S.Paulo).1908.

5. *Micheel, F. & Jung, F.* — Ztschr.Physiol.Chem. 239:217.1936.

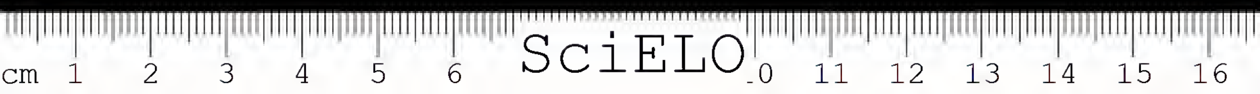
6. *Wieland, H. & Konz, W.* — S B. math.-nat.Abt.bayr.Akad.Wiss. :177.1936 — Chem. Ztbl. :1456.1936(I).

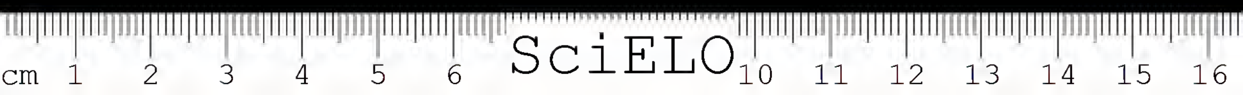
7. *Hahn, G. & Ostermayer, H.* — Ber.Dtsch.chem.Ges. 69:2407.1936 — Chem.Ztbl. :634.1937(I).

8. *Reinert, M.* — Festschrf.f.E.Chr.Carell,Basel :411.1936.

9. *Amaral, A. do* — Rev.Mus.Paulista 15:91.1927.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

612.3141:598.122

ESTUDOS CHIMICOS SOBRE OS VENENOS OPHIDICOS

2. Sobre a forma de ligação do enxofre

POR

C. H. SLOTTA & H. L. FRAENKEL-CONRAT

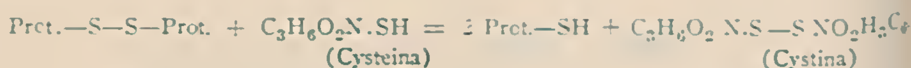
INTRODUCÇÃO

A analyse do nosso veneno usual de *Crotalus t. terrificus* secco accusou C = 47,5%, H = 5,9%, N = 13,2%, S = 3,4% (O = 30,0%). Outros auctores (1) encontraram num veneno de *Crotalus t. terrificus*, provavelmente apenas seccado ao ar, C = 43,4%, H = 6,6%, N = 12,6% e S = 2,9%, o que concorda perfeitamente com os nossos valores, tomando-se em consideração os 10,8% de agua contidos no veneno, que elles certamente analysaram. Comparando-se estes dados da analyse com a media das analyses das proteinas (C = 50-54%, H = 6,5-7,3%, N = 17,0 — 17,6%, S = 0,3-2,3%, O = 21,5-23,5%), o que mais se salienta é o alto teor de oxygenio e de enxofre no veneno. O primeiro nos leva a suppor que compostos ricos em oxygenio — como as glycidas — entram em grande parte na constituição do veneno, á semelhança de outras substancias proteicas. O alto teor em enxofre poude ser igualmente observado nos venenos de ophideos; assim encontraram-se 3,2% de enxofre no veneno natural e 5,1% (2) no purificado de *Naja naja;* e 4,6% no veneno natural e 5,5% no purificado de *Naja flava* (3).

Surprehendeu-nos, assim como aos auctores desses trabalhos citados, o facto de não poderem ser verificados grupos -SH livres com nitroprsussito de sodio e reagente de Folin; no entanto, pudemos encontrar, no veneno de *Crotalus t. terrificus* após reducção com acido sulfuroso, grupos — SH como o reagente de

Folin, o que não nos tinha sido possivel alcançar com nitroprussito de sodio, q
em si já é de reacção menos sensivel. Micheel (4), ultimamente, parece
observado algo de parecido com o veneno de *Naja*, si é que interpretamos devi-
mente uma observação feita em seu ultimo trabalho.

Dá-se algo semelhante com uma outra substancia proteinica, physiologi-
mente muito activa, a insulina, a qual contem um teor de enxofre na mes-
ordem de grandeza (3,3%), o qual não existe, nem sob a forma de grupos -S-
nem em ligações -S-S-facilmente reduziveis (5). Ha já varios annos, foi m-
trado (6) que a cysteina (-SH) representa um meio de reducção especifico pa-
as ligações -S-S- proteinicas, sendo por sua vez deshydrogenada para cys-
(-S-S-):



$$\text{Prot.—S—S—Prot.} + \underset{\text{(Cysteina)}}{C_3H_6O_2N.SH} = 2\ \text{Prot.—SH} + \underset{\text{(Cystina)}}{C_3H_6O_2N.S—S\ NO_2H_5C_3}$$

De accordo com esses dados, conseguiu-se finalmente (5a, b) provar que
enxofre na insulina está realmente ligado em forma de pontes -S-S-. Pela ac-
especifica da cysteina, estas pontes puderam ser destruidas e isto com perda co-
pleta da actividade do hormonio.

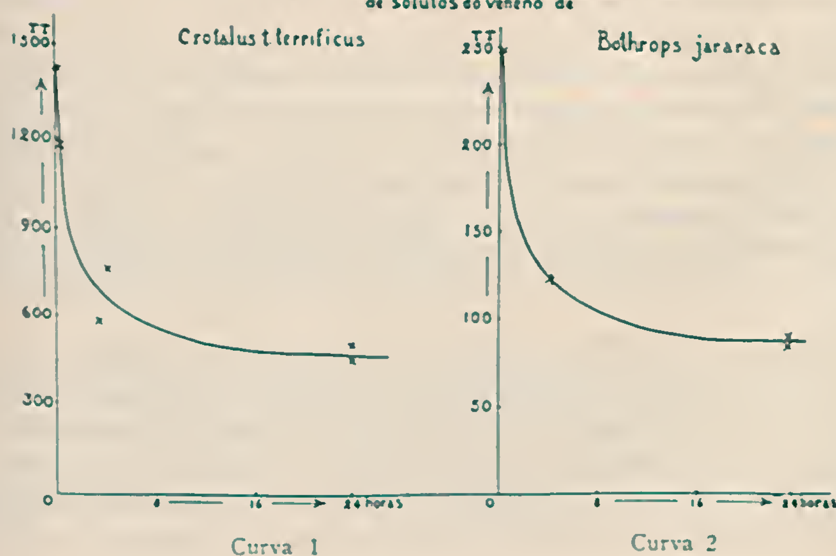
Tratando-se, no caso da reacção de cysteina (-SH) com proteina (-S-S-
da deslocação de um estado de equilibrio, é natural que, para alcançar um ren-
mento quantitativo de proteina (-SH), se necessite de um grande excesso
cysteina. Além disso, a reacção depende grandemente do pH (5b); pois, a u-
pH inferior a 6, ella não se manifesta; num pH=6-7 é ainda bastante lenta,
passo que se mostra cada vez mais rapida á medida que cresce a alcalinidade.
Assim é que um pH = 7,5-8.0 se mostrou optimo para as proteinas fortemen-
sensiveis aos alcalis, como, por exemplo, a insulina.

Experiencias

Era, pois, indicado estudarmos a influencia da cysteina (-SH) sobre o no-
veneno de *Crotalus t. terrificus*. Empregámos para esse fim o veneno rece-
extrahido, muito activo, sem qualquer purificação. Com effeito, fôra verificad-
tanto por nós como por outros auctores (4), que os resultados de experiencia-
com venenos ainda não purificados podem ser relacionados directamente, e-
principio, com a neurotoxina pura. Para isso addicionámos uma quantidade -
vezes maior de cysteina (-SH) ao nosso soluto do veneno; acertámos o seu p-
a 7,6 com carbonato de sodio e tampão de phosphato. Determinámos, entã-
depois de varias horas de repouso á temperatura ambiente, a toxicidade, que
decahira rapidamente (Vide curva 1). O facto de a toxicidade não haver desap-
parecido completamente parece ser devido á formação de um equilibrio; em to-

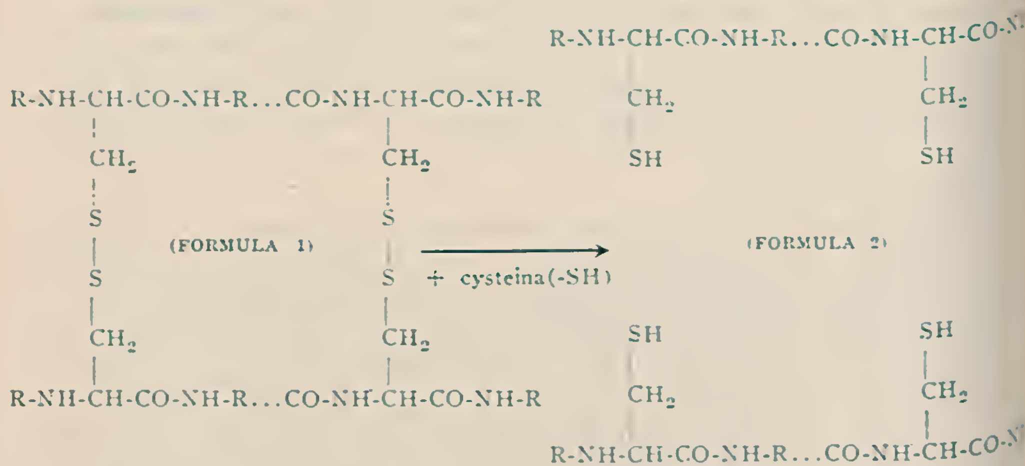
caso, com excesso ainda maior de cysteina, pudemos diminuir bastante mais o teor de toxicidade. Para controlo, fizemos passar uma corrente de oxygenio por uma parte do soluto de cysteina (-SH) sob addição de uma dose minima de iões cupricos como catalysador oxydante, até se dar a reacção negativa dos grupos -SH com nitroprussito de sodio, i. é. até á presença exclusiva de cystina (-S-S-), que se precipitou parcialmente. Esta suspensão de cystina (S-S-) foi addicionada a uma parte do soluto de veneno já regulado a um pH=7,6, sendo a mistura guardada sob as mesmas condições que o outro soluto, e controlados os seus teores de toxicidade simultaneamente. O teor de toxicidade do soluto de controlo não cahiu em absoluto durante o tempo de experiencia. Tanto o soluto toxico com cysteina (-SH), como o com cystina (-S-S-), tinha no final do ensaio o mesmo pH (7,6) que no começo.

Paralellamente, submettémos aos mesmos ensaios o veneno da *Bothrops jararaca*, que é a serpente mais abundante no Brasil meridional. Este veneno, possuindo apenas a sexta parte da toxicidade do *Crotalus t. terrificus*, perdeu proporcionalmente em toxicidade, como mostra a curva 2, enquanto os controlos, effectuados de modo identico que para o veneno de *Crotalus t. terrificus*, não deixaram entrever queda do teor de toxicidade, ou apenas um decrescimo dentro dos limites de erro. Infelizmente, não dispunhamos de veneno fresco de *Naja flava* ou *Naja naja*. O preparado, bastante antigo, de veneno de *Naja naja*, que possuiamos, encerrava apenas a septima parte da actividade registada por outros, donde o facto de termos preferido repetir inteiramente esses ensaios com um veneno fresco.



Curva 1 Curva 2

Esses ensaios de desintoxicação apenas podem ser interpretados pelo desdobramento das pontes -S-S- sob perda da actividade neurotoxica, mediante a influencia da cysteina (-SH) sobre os componentes neurotoxicos do veneno ophidico, conforme mostram as Formulas 1 e 2. Do mesmo modo como se deu com a insulina, foi-nos impossivel ligar por dehydrogenação com cystina (-S-S-) os grupos -SH, de modo que a actividade neurotoxica do veneno fosse recuperada.



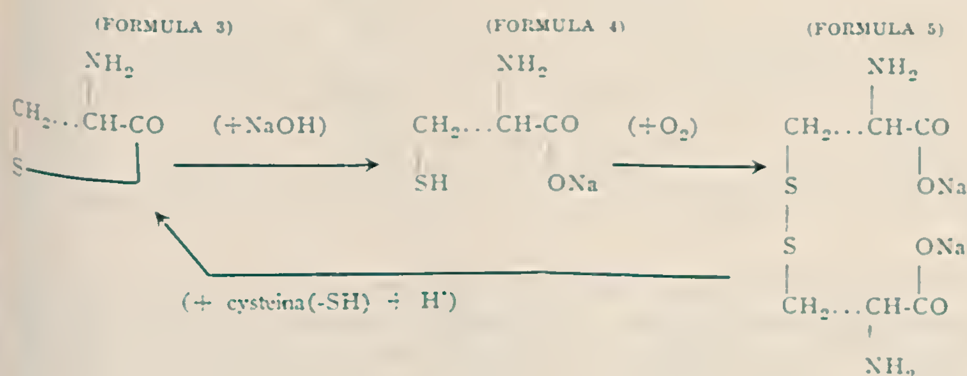
DISCUSSÃO

Recentemente, Micheel e collaboradores descreveram (3, 4) um enriquecimento consideravel da neurotoxina no veneno de *Naja*. Nesses trabalhos tão importantes foi estabelecida uma hypothese sobre a ligação do enxofre no veneno ophidico, hypothese esta que está em contradicção completa com o nosso ponto de vista. E' verdade que trabalhamos com especies de venenos ophidicos differentes das que foram utilizadas pelos citados auctores; contudo, cremos que o enxofre contido nos componentes neurotoxicos de todos os venenos ophidicos esteja ligado, de maneira semelhante, nas moleculas; temos, com effeito, a impressão, baseada em innumeras observações, de que o arranjo dos elementos constitutivos desse grupo de substancias naturaes não apresenta *differenças fundamentaes.*

Micheel (3), como nós a principio, tampouco conseguiu verificar, com as reacções usuaes, ligações de -SH ou de -S-S-, e chegou assim á hypothese de que o enxofre no veneno ophidico está contido sob uma forma de ligação bem diversa da das proteinas communs, i. e., da thiolactona (Formula 3). Desde que segundo seus estudos a neurotoxina de *Naja flava* tem um peso molecular de 2500-4000 e um teor de enxofre de 5,5%, a molecula contém de 4 a 7 atomos de

enxofre. De seu trabalho não se deprehende si todos, ou apenas alguns destes atomos de enxofre, são abrangidos por ligações de thiolactona; em todo caso, elle suppõe que a toxicidade da substancia está intimamente ligada ao grupo ou aos grupos thiolactonicos.

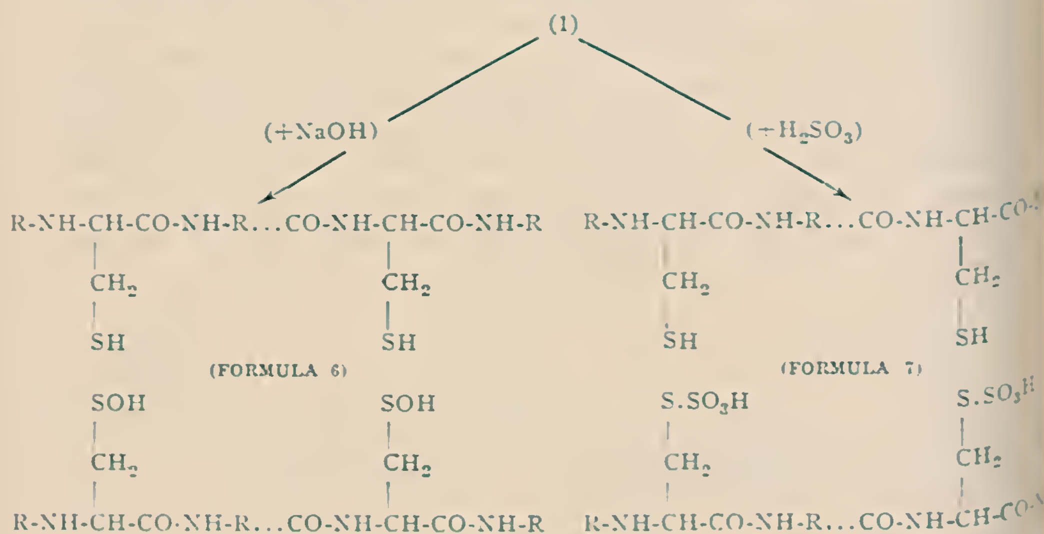
Apoia sua hypothese no seguinte ensaio: deixou, durante 24 horas, actuar oxygenio, a um pH=9-10, sobre o soluto do veneno, que assim perde 50% de sua toxicidade. Esse mesmo soluto foi então tratado com cysteina (-SH) a um pH=2-3, recuperando deste modo a metade da actividade perdida. Para esclarecer o processo dessa reacção, indicou o seguinte eschema: em presença do alcali, o annel thiolactonico se abre (Formula 3): com oxygenio, o thiol, assim formado (Formula 4), é deshydrogenado até á forma inactiva de bisulfureto (Formula 5); esta, por sua vez, mediante cysteina (-SH) em excesso, torna-se novamente, por intermedio dum acido-thio-carbonico, em thiolactona (Formula 3).



Depois de termos provado a existencia de grupos -S-S- nos venenos á nossa disposição, podemos dar a seguinte explicação ao ensaio de Micheel: pela hydrolyse alcalina, taes pontes-S-S- são desdobradas em thioes e acidos sulfenicos instaveis, i. é, as neurotoxinas da Formula 1 passam para as ligações correspondentes á Formula 6. Esta mudança occorre espontaneamente em ambiente fracamente alcalino e é accelerada pelo oxygenio (7), de modo que a inactivação observada é perfeitamente esclarecida.

A *reactivação* parcial do producto obtido com cysteina (-SH) em soluto acido parecia-nos, desde o principio, um tanto duvidosa. Agora Micheel declara, em seu ultimo trabalho (4), que a reactivação de taes "productos de oxydação" pela reducção com cysteina (-SH) foi "alcançada apenas em alguns casos, sendo impossivel reproduzir com segurança as condições de reacção". Mesmo no caso de Micheel não ter tido em mão um producto de desdobramento por hydrolyse,

mas sim o composto de -S-S- inactivo exigido por seu eschema, jamais lhe terá sido possivel reduzil-o sob as condições por elle indicadas. As pontes -S-S- em proteinas só podem ser hydrogenadas com cysteina (-SH) em solutos quasi neutros ou alcalinos, como já dissemos uma vez. No entanto, jamais os especialistas nesse assumpto (5.6) conseguiram essa reacção a um pH=2-3, do modo indicado por Micheel.



Como é que Micheel chegou á sua hypothese, tão complicada? O mais facil seria, naturalmente, suspeitar a occorrencia do enxofre em pontes -S-S-, tratando-se de proteinas isentas de thiol, mas ricas em enxofre, e que são desdobraveis pela cysteina (-SH). Isto Micheel não conseguiu esclarecer, não porque faltem pontes-S-S- no veneno, mas sim porque lhe passou despercebido que a reacção depende grandemente do pH, o que somos obrigados a admittir á luz dos seus estudos, que acabámos de citar, nos quaes elle suppõe ter conseguido a reducção a um pH=2-3 com cysteina (-SH).

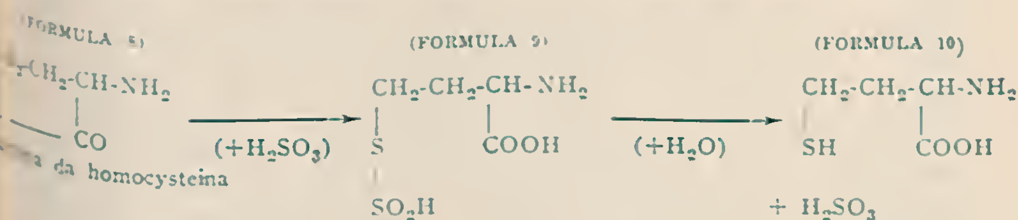
Embora isso nos parecesse pouco acertado, á luz da literatura, para nossa melhor orientação procurámos inactivar, com cysteina, solutos de veneno a um pH=4-5, i. é, com menos acido do que no caso de Micheel; no entanto, mesmo depois de algumas semanas, não pudemos observar qualquer queda do teor de toxicidade.

Preso áquella sua hypothese certamente erronea, Micheel tambem em seus novos trabalhos (4) omitte essa explicação (que ora damos) tão clara a seus interessantes ensaios. Si elle deixa repousar algumas horas solutos diluidos de veneno com bisulfito, surgem os seguintes phenomenos:

"1) apparecimento de grupos-SH: 2) apparecimento de um precipitado insoluvel em agua, com um teor de enxofre mais elevado; 3) deslocação da rotação optica em sentido negativo; 4) inactivação do effeito toxico".

Repetimos as experiencias de Micheel com o nosso veneno de *Crotalus t. terrificus* e chegámos a resultados correspondentes. Tambem em nosso caso precipitou-se mais ou menos em peso a metade da quantidade da materia prima e a substancia retida no soluto deu, com o reactivo de Folin, a reacção nitida dos grupos -SH. A rotação optica variou no mesmo sentido e em proporções semelhantes. Precipitado e soluto são practicamente atoxicos. Tudo isto é mais uma prova de que se pode transmittir, com o devido criterio, os resultados obtidos com venenos de *Naja* para a chimica dos venenos de *Crotalus* e vice-versa.

Micheel procurou esclarecer a influencia de bisulfito sobre o veneno com uma scisão do seu annel thiolactonico. Como experiencia modelo, elle indicou o tratamento da lactona da homo-cysteina (Formula 8) com bisulfito, onde apparecem, por hydrolyse subsequente do composto primario (Formula 9), os grupos -SH (Formula 10). Mas, com a apresentação deste seu eschema, não se pode esclarecer explicitamente o apparecimento simultaneo de um thiol e de um composto mais rico em enxofre no veneno ophidico. Podendo a substancia mais rica em enxofre ser dissolvida em alcali e precipitada quasi quantitativamente com acido, como nós verificámos, não deve ella ser tão sensivel a effeitos hydrolyticos, o que se devia suspeitar á luz do eschema de Micheel.



Segundo a nossa concepção, as neurotoxinas são substancias com ligações -S-S-; portanto, a sua reacção com sulfito é de facil explicação. As pontes -S-S- são desdobradas pelo acido sulfuroso, no sentido da Formula 7, em um thiol e um acido thiosulfonico. Com effeito, é esta a reacção commum e normal para substancias com pontes -S-S-. Com sulfato de sodio não se dá simplesmente a reducção da cystina, o que se deduz do não-apparecimento de sulfato de sodio; ao demais, só a metade da cystina pode ser transformada em cysteina, emquanto a outra forma o acido cysteino-sulfonico (8).

Dessa maneira explicam-se as 4 observações feitas por Micheel e amplamente por nós comprovadas: 1) o composto thiolico é relativamente bem soluvel e os grupos thiolicos tambem podem ser verificados no soluto; 2) o composto do acido

thio-sulfonico é pouco soluvel a frio e bem estavel, possuindo naturalmente ca. 2 vezes o teor de enxofre que a neurotoxina; 3) a variação da rotação optica é comprehensivel, mesmo assim não permitte tirar conclusões de grande alcance; 4) o desapparecimento da toxicidade em relação á desintoxicação da neurotoxina não é de admirar, dando-se, por desdobramento, reducção, ou hydrolyse.

Em outra serie de experiencias (4) Micheel conseguiu desintoxicar a sua neurotoxina por oxydação com oxygenio, em ambiente acido por addição de cysteina (-SH) e muito oxydo cuproso. Segundo as experiencias de outros (9), a cystina (-S-S-) se oxyda lenta, mas quasi completamente em solução acida, dando acido cysteinico $HO_3S.CH_2.CH(NH_2).COOH$. Si bem que nas experiencias de Micheel a solução fosse menos acida e o tempo mais breve, é emprega, porém, muito catalysador de metal pesado e forte corrente de oxygenio. Em todo caso acreditamos que, em suas experiencias, se haja dado o desdobramento das pontes -S-S- do veneno, por oxydação.

Em geral, pelas nossas experiencias ficou unanimente provado que nas diversas neurotoxinas existem pontes-S-S- normaes, que são de importancia decisiva para o effeito do veneno. Como pensamos ter mostrado, todos os factos observados por Micheel falam a esse favor e não contra.

Em todas as outras proteinas altamente activas (p. ex., insulina, proteinases, toxinas, virus) até agora não se descobriu entre os amino-acidos, encontrados como productos de desdobramento, um que fosse particularmente caracteristico quanto á sua estructura ou quantidade, para a proteina activa correspondente. A natureza parece construir sempre as proteinas com os componentes já conhecidos; a actividade parece depender mais da estructura geral do que de poucos componentes heterogeneos. A theoria de Micheel requer um agrupamento de atomos, no qual um grupo thiolico deveria estar localizado em uma posição favoravel para fechar o annel lactonico, digamos na posição δ, quanto a um grupo carboxylico. Um tal composto ainda não é conhecido entre os productos de desdobramento de substancias proteinicas. No entanto, justamente nas proteinas altamente activas o seu teor de -SH e -S-S- é de importancia decisiva: a insulina perde sua actividade pela hydrogenação das pontes -S-S-, enquanto que as proteinases cathepticas por ella se tornam mais activas.

Protocollo das experiencias.

I. *Desintoxicação do veneno de* **Crotalus t. terrificus** *com cysteina* (-SH)

Foram preparados os seguintes solutos:

a) *Soluto de veneno*: 4 mgs. de veneno de *Crotalus t. terrificus* foram dissolvidos em 4 cc. de soluto a 8,5% de chloreto de sodio.



b) *Soluto de cysteina*: 75 mgs. de hydrochloreto de cysteina (Kahlbaum) foram dissolvidos com 50 mgs. de carbonato de sodio em 7,5 cc. de agua, tratada previamente com uma corrente de nitrogenio, e 3 cc. desse soluto, mantidos sob nitrogenio.

c) *Suspensão de cystina (-S-S-)*: os restantes 4,5 cc. do soluto foram misturados com um pouquinho de chloreto de cobre, deixando-se atravessar uma corrente de oxygenio até que a prova de nitroprussito de sodio fosse negativa (30 minutos).

Experiencia feita com uma quantidade de cysteina 20 vezes maior.

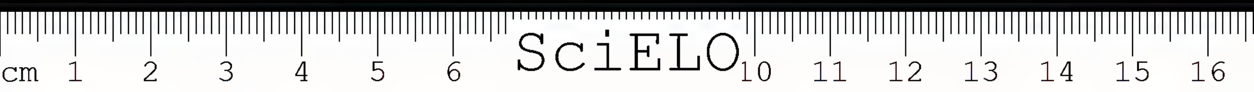
Addicionaram-se a 10 cc. de um soluto de phosphato-tampão de pH=7,5, pelo qual tinha passado durante muito tempo uma corrente de nitrogenio, 1,5 cc. de um soluto de veneno (a) e 3 cc. de um soluto de cysteina (-SH), sendo completada até a marca de 25 cc. e a mistura, depois de expellido o ar com nitrogenio, posta a repousar num balãozinho com rolha esmerilhada a 21°.

Na contra-prova, addicionaram-se, a igual quantidade de soluto de tampão e de veneno (a), 3 cc. de suspensão de cystina (-S-S-) (c), sendo o volume completado com agua até a marca (25 cc.), e guardada a mistura como acima. O pH nos solutos de experiencia e controlo era = 7,6 no inicio da prova e 24 horas mais tarde.

Em series de 6 camondongos foram injectados os dois solutos 15 minutos, 3 horas e 22 horas mais tarde e, assim, obtida a D.M.L. do veneno. A unidade de camondongo (U.C.) do nosso veneno natural era de 0,8 gamma. Na prova de controlo, esse teor permaneceu estavel (=0,8 gamma). Na prova com cysteina (-SH), elle importava em 1,0 gamma, depois de 15 minutos; 2,0 gammas, depois de 3 horas; e 2,4 gammas, depois de 24 horas. Depois de descontados 15,6% (teor de humidade do veneno tomado em consideração) e calculados os teores de toxicidade (T.T.), verificou-se a queda da toxicidade, a qual se vê reproduzida na Curva 1. Essa experiencia foi repetida sob as mesmas condições e os resultados, lançados na mesma curva.

Experiencia com uma quantidade de cysteina 40 vezes maior.

40 mgs. de hydrochloreto de cysteina e 27 mgs. de carbonato de sodio foram addicionados a um soluto de 2 mgs. de veneno de *Crotalus t. terrificus* em 0,2 cc. de sôro physiologico, 2,4 cc. tampão de phosphato e 2,4 cc. de agua, tratados com nitrogenio, e, 24 horas mais tarde, accrescentada a mesma quantidade de hydrochloreto de cysteina e carbonato de sodio; desse modo, no total realmente existia 40 vezes mais cysteina do que veneno. A U. C. do veneno assim tratado



era, no dia seguinte, superior a 9,0 gamma; o T.T. era menor do que 110, de modo que cahiu até 5%.

II. *Desintoxicação do veneno de* **Bothrops jararaca** *com cysteina (-SH)*

a) *Soluto de veneno*: 8,8 mgs. de veneno de *Bothrops* foram dissolvidos em 1,1 cc. de um soluto a 8,5% de chloreto de sodio.

b) *Soluto de cysteina*: 220 mgs. hydrochloreto de cysteina e 148 mgs. de carbonato de sodio foram dissolvidos em uma mistura de 4,5 cc. tampão de phosphato (pH=7,5) saturado com nitrogenio e 6,1 de agua; e 4,5 cc. desse soluto foram conservados sob nitrogenio.

c) *Soluto de cystina (-S-S-)*: A cysteina no soluto restante foi, conforme descripção acima, transformada em cystina (-S-S-) por meio de oxygenio.

4,5 cc. de soluto de cysteina (-SH) (b) foram accrescentados de 0,5 cc. de um soluto toxico de *Bothrops* (a) e conservados a 21° sob nitrogenio.

Para controlo, misturaram-se 4,5 cc. de uma suspensão de cystina (-S-S-) com 0,5 cc. de soluto toxico (a).

A U. C. do nosso veneno de *Bothrops* era de 4 a 5 gammas. O veneno na prova de controlo, constante de 4 a 24 horas, accusava uma U.C. de 4,5 gammas. O veneno tratado com cysteina (-SH) accusava, depois de 4 horas, uma U.C. de 9,0 gammas; depois de 24 horas, 11,2 gammas; e, numa repetição da experiencia, 11,7 gammas. Depois de descontados 10,% (teor de humidade do veneno de *Bothrops*) e calculados em T.T., observou-se a queda descripta na Curva 2.

III. *Influencia de bisulfito de sodio sobre o veneno de* **Crotalus t. terrificus**

1) 22 mgs. de veneno de *Crotalus t. terrificus* e 66 mgs. bisulfito de sodio foram dissolvidos em 3 cc. de agua e o soluto, deixado a repousar á temperatura ambiente; 17 horas mais tarde, surgiu um precipitado. A suspensão tinha uma U.C. de 20 gammas, isto é, um T.T. de apenas 50 unidades a mais. O precipitado pesava 9,8 mgs. depois de seccado no alto vacuo. Não se dissolveu em 0,1/N de ammoniaco, sendo no entanto soluvel em 1,2 cc. 0,1/N hydroxydo de sodio, podendo ser novamente precipitado em 1 cc. 0,1/N de acido chlorhydrico, com o que se recuperam 7,8 mgs. de uma substancia secca.

2) 20 mgs. do veneno de *Crotalus t. terrificus* em 0,2 cc. de um soluto de chloreto de sodio a 4,25% foram misturados com 2 porções differentes de bisulfito de sodio em 2 cc. de agua:

Experiencia *a*: com 20 mgs. de bisulfito de sodio.

Depois de 4 horas, formaram-se 3,6 mgs. de precipitado: depois de 24 horas, novamente 3,6 mgs.; e dois dias mais tarde, outros 2,9 mgs., o que perfez um total de 10,1 mgs. A U.C.depois de 4 horas era de 3 gammas e o T.T., portanto, apenas 333.

Experiencia *b*: com 40 mgs. de bisulfito de sodio.

Depois de 4 horas obtiveram-se 5,6 mgs. de precipitado; depois de 24 horas 7,1 mgs., depois do qual não se formou nenhum outro precipitado. A quantidade total era portanto de 12,7 mgs.

3) A reacção foi repetida com soluto diluido afim de evitar uma precipitação do producto. 35 mgs. de veneno de *Crotalus t. terrificus* foram dissolvidos com 2,5 cc. de um soluto de chloreto de sodio a 8,5%, sendo-lhes addicionado 1 cc. de um soluto de bisulfito de sodio a 5% e completada a marca com agua até 25 cc. A rotação optica foi:

ao principio da experiencia	32,1° ± 3,6°
depois de 1 hora	42,9° ± 3,6°
depois de 17 horas	55,0° ± 5,4°

Este ultimo valor não se alterou nem depois de outras 24 horas.

RESUMO

Os teores de toxicidade decahem rapidamente ao se deixarem repousar os solutos de veneno de *Crotalus t. terrificus* e de *Bothrops jararaca* com um grande excesso de cysteina (-SH) a um pH=7, 6 e á temperatura usual, enquanto os solutos de controlo conservam o mesmo teor de toxicidade com cystina (-S-S-) dentro do mesmo prazo de experiencia e sob as mesmas condições. A cysteina (-SH) é um meio de reducção especifico para as ligações -S-S- em proteinas. Com isto ficou provado que os compostos neurotoxicos do veneno ophidico contêm ligações normaes de -S-S-, cuja presença desempenha o papel preponderante na acção neurotoxica. O facto de que a queda da toxicidade corresponde essencialmente a uma acção sobre o componente neurotoxico, decorre da propria determinação da D.M.L. e dos phenomenos sob os quaes os animaes perecem.

Pode-se, portanto, excluir a hypothese de Micheel de que o enxofre esteja presente, nas neurotoxinas das serpentes, em ligações thiolactonicas.

ZUSAMMENFASSUNG

Beim Stehenlassen der Loesungen der Gifte von *Crotalus t. terrificus* und *Bothrops jararaca* mit einem grossen Ueberschuss von Cystein (-SH) bei pH

7,6 und unter gewoehnlicher Temperatur nehmen die Giftwerte ausserordentlich schnell ab, waehrend Kontroll-Loesungen mit Cystin(-S-S-) innerhalb der Versuchszeit unter denselben Bedingungen denselben Giftwert behalten. Nun ist Cystein(-SH) ein spezifisches Reduktionsmittel fuer -S-S- Bindungen in Proteinen. Somit ist bewiesen, dass die neurotoxische Komponente des Schlangengiftes normale -S-S-Bindungen enthaelt, und dass das Vorhandensein dieser fuer die Wirkung des Neurotoxins eine wesentliche Rolle spielt. Dass es sich naemlich bei der Giftwertsabnahme im wesentlichen um die Beeinflussung der neurotoxischen Komponente des Schlangengiftes handelt, folgt aus der Art der Bestimmung der D.M.L. und den Erscheinungen, unter denen die Tiere sterben.

Die Hypothese von Micheel, dass der Schwefel in den Neurotoxinen der Schlangen in Thiolacton-Bindung vorhanden sei, wird abgelehnt.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Tetsch, Chr. & Wolff, K.* — Biochem. Zschr. 288:126.1936.
2. *Wieland, H. & Konz, W.* — S. B. math.-nat. Abt. bayr. Akad. Wiss. :177.193
3. *Micheel, F. & Jung, J.* — Zschr. physiol. Chem 239:217.1936.
4. *Micheel, F., Dietrich, H. & Bischoff, S.* — Zschr. physiol. Chem. 249:157.1937.
5. a) *du Vigneaud, V., Fitch, A., Pekarek, E. & Lockwood, W. W.* — J. Biol. Chem. 94:233.1932-33.
   b) *Wintersteiner, O.* — J. Biol. Chem. 102:473.1933.
   c) *Freudenberg, K. & Wegmann, Th.* — Zschr. physiol. Chem. 233:159.1935.
6. *Mirsky, A. E. & Anson, M. L.* — Proc. Soc Exp. Biol. & Med. 28:170.1930.
7. a) *Schoeberl, A.* — Ann. Chemie 507:111.1933; Collegium 795(VII):412.1936.
   b) *Fruton, J. S. & Clarke, H. T.* — J. Biol. Chem. 106:667.1934.
8. a) *Clark, H. T.* — J. Biol. Chem. 97:235.1932.
   b) *Schoeberl, A. & Ludwig, E.* — Ber. dtsch. chem. Ges. 70:1422.1937.
9. *Andrews, J. C.* — J. Biol. Chem. 97:657.1932.

(Trabalho da Secção de Chimica e Pharmacologia Experimentaes do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro 1937).



612.31412:615.94:598.122

ESTUDOS SOBRE OS VENENOS OPHIDICOS

3. Teor da coagulação e da lecithinase

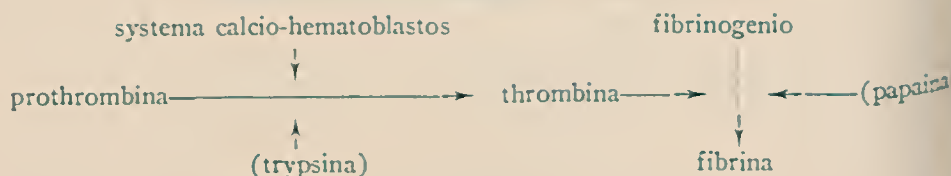
POR

C. H. SLOTTA; G. SZYSZKA & H. L. FRAENKEL-CONRAT

Todos os venenos ophidicos contém, em quantidades variaveis, enzymas proteolyticas e outras, ao lado das neurotoxinas que, conforme já mostrámos, representam composições proteinicas com pontes —S—S—. Os venenos que contém relativamente poucos principios neurotoxicos, apesar de serem bastante perigosos, produzem um effeito principalmente nocivo a outros tecidos. Essas lesões, representadas sobretudo por edemas e phenomenos hemorrhagicos, são apparentemente provocadas pelas enzymas proteolyticas e coagulantes. No principio deste seculo, investigou-se minuciosamente uma outra enzyma dos venenos ophidicos, que, todavia, na sua toxicidade não desempenha um papel tão importante como, de inicio, se suppusera. Esta enzyma é a lecithinase que scinde o acido gorduroso central da lecithina, formando assim a lysolecithina, que produz a hemolyse, i. é, a dissolução dos globulos vermelhos do sangue. Dessa enzyma mais tarde trataremos pormenorizadamente.

O complexo das enzymas proteolyticas dos venenos ophidicos ainda foi pouco investigado. Aquellas que actuam sobre o mechanismo de coagulação, foram objecto de recente estudo e interessante artigo de Eagle (1). Normalmente, parece ser o seguinte o processo da coagulação do sangue: a prothrombina sob a influencia do chamado systema calcio-hematoblastos é transformada em thrombina, substancia que tem o poder de transformar o fibrinogenio em fibrina. Em vez desse systema, pode-se obter, de modo artificial, a coagulação, fazendo-se agir a papaina sobre o fibrinogenio, precipitando-se a fibrina; pode-se tambem, em logar desse systema, empregar a trypsina, a qual transforma igualmente a prothrombina em thrombina. Eagle observou ainda que o papel da trypsina pode ser exercido por uma enzyma, como, p. ex., a que se encontra

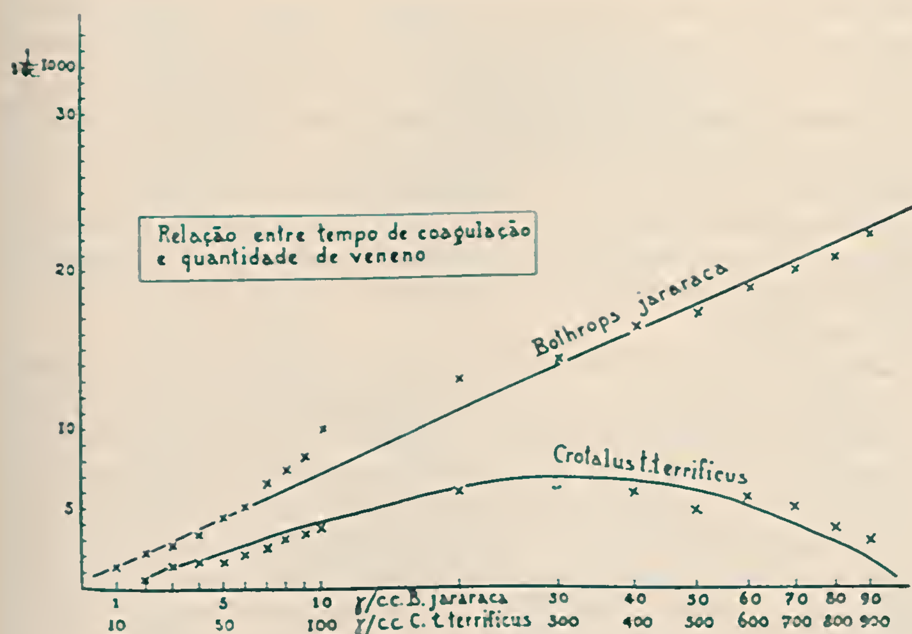
no veneno de *Bothrops jararaca* ou *Bothrops atrox*. Estes dois venenos con-têm, além dessa, uma outra enzyma que transforma o fibrinogenio em fibrina ou pelo menos em um complexo semelhante á fibrina. O effeito coagulante do veneno de *Crotalus t. terrificus* parece ser exercido apenas por uma enzyma deste ultimo typo. Esta enzyma toma, pois, o logar da thrombina, ou da pa-paina.



Finalmente, em certos venenos, dos quaes mais nos interessam os de *Crotalus atrox*, *Naja flava* e *Naja naja*, pode-se verificar a presença de enzymas, que destroem a prothrombina e o fibrinogenio e, por isso, taes venenos, encarados de um modo geral, não têm acção coagulante.

Eagle provou que o veneno das especies de *Bothrops*, já em concentrações muito diminutas, pode transformar a prothrombina em thrombina, enquanto que esta reacção difficilmente se verifica com o veneno de *Crotalus t. terrificus*. O effeito muito mais accentuado do veneno de *Bothrops jararaca*, no que se refere á coagulação, decorre especialmente de sua capacidade em produzir com extrema rapidez a quantidade sufficiente de thrombina. O veneno de *Crotalus t. terrificus* somente coagula, devido a um factor semelhante á papaina, o qual transforma o fibrinogenio directamente em fibrina. Nesse particular, nossas experiencias concordam perfeitamente com as de Eagle.

Para os nossos fins mostrou-se pratico não fazermos differença entre as diversas phases do mechanismo de coagulação. Nas provas utilizámos o resultado global desses processos, i. é, a coagulação de sangue oxalatado. Addicionando-se do veneno a ser examinado quantidades crescentes, mas sempre dissolvidas na mesma quantidade de soluto physiologico, á mesma quantidade de sangue oxalatado, este coagula em prazos decrescentes. Em concentrações muito elevadas, o veneno augmenta o tempo de coagulação, o que se deve attribuir a outros factores destructivos. Essa variação torna-se mais patente quando apresentados em curvas os valores alcançados, registando-se nas ordenadas o respectivo prazo de coagulação em segundos por 1000, e lançando-se nas abcissas em escala logarithmica o peso do veneno em *gammas*, contido em 1 cc. da mistura de sangue e veneno. Dessas curvas de coagulação temos um exemplo na seguinte, que corresponde ao veneno de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus t. terrificus*.



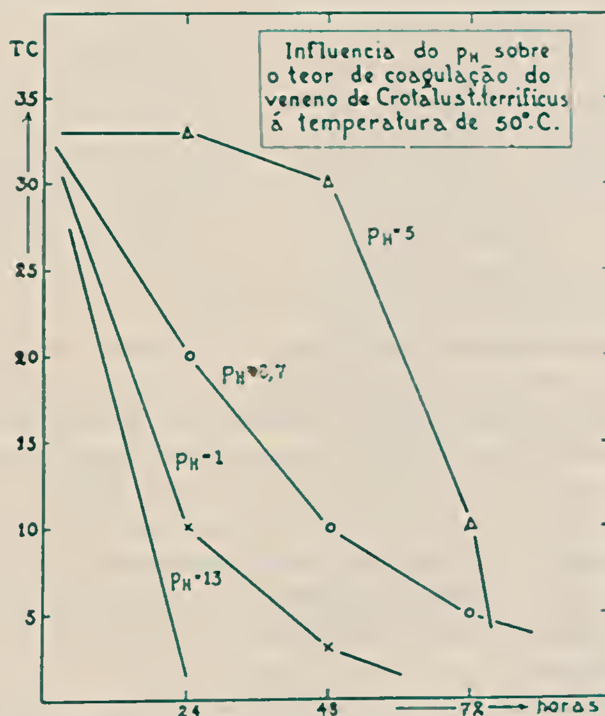
Em nossos ensaios de enriquecimento dos componentes neurotoxicos, feitos com o veneno de *Crotalus t. terrificus*, tivemos de registar, ao mesmo tempo, a acção favoravel ou desfavoravel do tratamento chimico sobre a acção do principio coagulante; por essa razão, tornou-se preciso determinar o teor de coagulação da fracção usada. Sendo impossivel estabelecer curvas para todos os graus de purificação, conforme os obtivemos, pareceu-nos mais simples e efficiente determinar esses teores de coagulação, de modo a fixarmos a quantidade minima de veneno, que, dissolvida em 1 cc. de soluto physiologico e addicionada a 5 cc. de sangue oxalatado, coagulasse os 6 cc. de liquido exactamente em 10 minutos. A esta quantidade de veneno em *gammas*, referida a 1 cc. (portanto, dividida por 6) chamamos de *unidade de coagulação (UCo)*. O *teor de coagulação (TCo)* é o numero que indica quantas UCo, assim obtidas, estão contidas em 1 mg. do preparado de veneno seccado no alto vacuo. Desse modo se obtêm numeros de facil determinação e retentiva, os quaes exprimem nitidamente o poder coagulante de um veneno. Os venenos das especies de *Bothrops* têm um TCo muito elevado, que oscilla entre 1445 (*Bothrops jararaca*) a 3300 (*Bothrops atrox*), enquanto o TCo de *Crotalus t. terrificus* é apenas de 30.

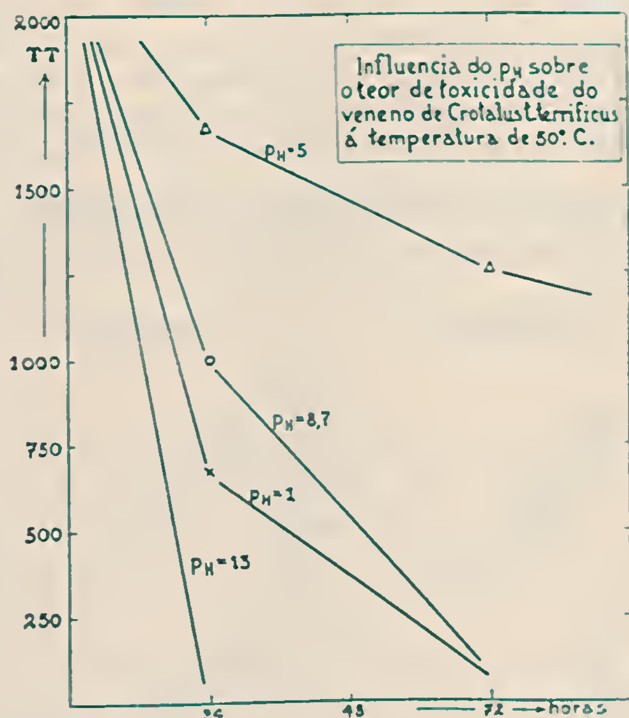
A determinação do TCo é, muitas vezes, igualmente util no reconhecimento do grau de pureza dos venenos. Segundo o trabalho de Eagle, o veneno de *Crotalus atrox* destroe a prothrombina, bem como o fibrinogenio e, porisso, não tem effeito coagulante.

Todavia, não somente sob o ponto de vista pratico é importante a determinação do TCo. Assim é que obtivemos, por meio da determinação comparativa dos TCo e TT de solutos de veneno de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus t. terri-*

ficus, expostos a certas influencias, resultados theoricos muito interessantes: segundo dissémos acima, o grande poder coagulante daquelle veneno bothropico é devido, no opinar de Eagle, a um componente semelhante á trypsina, ao passo que o poder coagulante daquelle veneno crotalico deve ser attribuido exclusivamente á sua enzyma de acção parecida á da papaina. Isto mesmo foi por nós comprovado de duas maneiras: a papaina distingue-se, com effeito, de outras proteinases por sua resistencia ao calor e pelo facto de poder ser activada por compostos contendo grupos --SH. A proposito pudemos provar claramente que a enzyma coagulante do veneno de *Crotalus t. terrificus* tambem possue estas duas propriedades.

Deixámos solutos de veneno sob differentes temperaturas e a differentes pH. Enquanto o principio neurotoxico e coagulante de solutos de veneno de *B. jararaca*, em temperaturas elevadas e mesmo a pH optimo, se mostra excepcionalmente instavel, tanto que após 24 horas a 50° o TT, assim como o TCo, cahiu a 4% (Vide Experiencia 5a.), os solutos de veneno de *Crotalus t. terrificus* se mostraram bem mais estaveis (Vide Experiencia 5d). Ao pH = 5, o TCo deste veneno permaneceu estavel durante 2 dias, mesmo a 50°, e o TT cahiu somente a 70% do teor inicial. Esses resultados tornam-se mais comprehensiveis á vista das curvas seguintes:



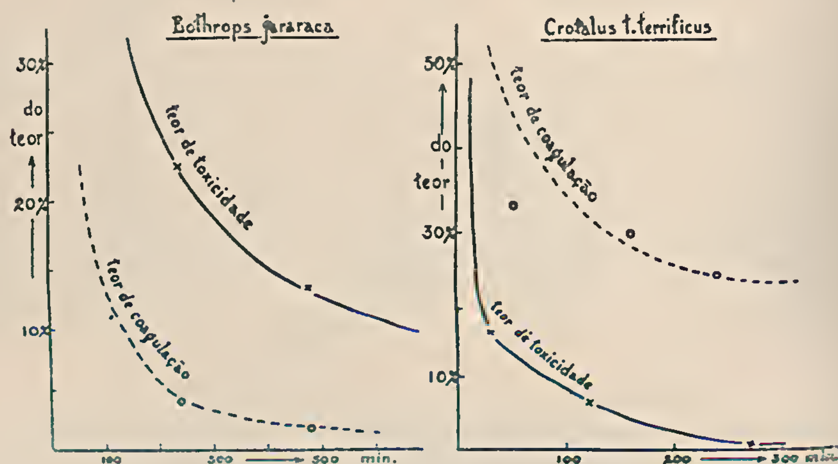


A resistencia, relativamente grande ao calor, da enzyma de coagulação do veneno crotalico, que, só por si, provaria a sua natureza semelhante á papaina, reproduz-se melhor ainda no seu comportamento (principalmente em comparação com a enzyma de coagulação do veneno bothropico) á cysteina (—SH): nisso, porém, deve-se levar em conta, conforme já mostrámos, aliás, no nosso artigo anterior, que todos os venenos ophidicos por nós examinados são extremamentes sensiveis a taes compostos —SH. Conforme verificámos em nossas experiencias, os componentes activos dos venenos são intimamente ligados, podendo-se destruir alguns por meio de certos processos, não sendo, porém, possivel separál-os sem perda de suas actividades. Assim, tivemos desde o inicio, quando addicionámos cysteina(—SH) ao veneno de *Crotalus t. terrificus*, que contar com uma perda das actividades do complexo total do veneno. Esta se mostrou sob a forma de queda do TT. Existindo no veneno de *Crotalus t. terrificus* um componente sob a forma de papaina, elle pode ser activado por meio de cysteina(—SH). Dessa maneira, porém, no inicio o TCo deste veneno diminue bem menos do que o TT.

Das experiencias No. 6 *a* e *b*, conclue-se que realmente o TCo do soluto de veneno crotalico, sob a influencia de cysteina (—SH), decahiu após 24 horas somente a 25% do teor inicial, ao passo que o TT após o mesmo tempo, no mesmo soluto, importava somente em 0.5% do teor inicial. No veneno bo-

thropico o TCo estava reduzido, após 4 horas, somente a 4% do original, porque o componente, de acção parecida com a trypsina, deste veneno não pode ser activado por meio de compostos —SH; enquanto isto, o TT importava em 23% do teor inicial. O resultado destas experiencias, que outra vez confirmam plenamente o trabalho de Eagle, torna-se bem claro á vista das seguintes curvas:

Queda do teor de toxicidade e teor de coagulação após addição de cysteina (-SH) aos solutos de veneno de:



Em *Bothrops jararaca* os TTCCoo decahem rapidamente e, em *Crotalus terrificus* bem mais lentamente, do que os TTTT.

Conforme já dissémos no começo, temos boas razões para attribuir aos componentes neurotoxicos e proteolyticos a maxima importancia na acção physiologica global do veneno ophidico. Esta supposição torna-se tanto mais viavel quanto se acredita, segundo as experiencias acima, que a enzyma coagulante está incluida no componente proteolytico.

Entretanto, é ainda importante na completa caracterização dos venenos, conhecer-se o seu teor em lecithinase. Para a determinação desta enzyma elaboramos tambem um methodo padrão. Propositalmente, não falamos em unidades hemolyticas, ou de poder hemolytico. No entanto, a enzyma *lecithinase* é responsavel pela hemolyse que occorre no organismo sob a acção do veneno, porém esse effeito é complexo pelo facto de existirem ainda outros principios no sôro, que, em parte, estimulam a acção da lecithinase e, em parte, a paralysam. Uma vez que não nos interessava examinar a symptomatologia das picadas de cobra, e que nossa orientação nos estudos não estava dirigida no sentido clinico, mas no puramente chimico, tinhamos que procurar um processo de de-

terminação para a lecithinase, que possivelmente excluisse aquella complexidade, fosse facilmente realizavel por outrem e se mostrasse capaz de indicar, realmente e, si possivel, exclusivamente, o effeito desta enzyma.

A reacção enzymatica entre a lecithinase e a lecithina depende muito, como qualquer processo enzymatico, da concentração assim do substrato como da enzyma, do pH, da temperatura e, principalmente, do tempo. Pelo contrario, a influencia da lysolecithina, formada, sobre as hematias não depende quasi do tempo: existindo concentração sufficiente de lysolecithina, o sangue hemolysa quasi instantaneamente. Precisavamos, consequentemente, de determinar antes a concentração minima de lysolecithina capaz de lysar hematias de determinada especie e em diluição determinada.

Para esse fim, da gema de ovo preparámos lysolecithina pura e com ella executámos ensaios sobre hematias de cavallo. Nosso preparado, muito purificado, conseguiu hemolysar, na quantidade de 60 γ e no volume de 2 cc., os globulos sanguineos quasi que instantaneamente. Essa mistura, além dos 60 γ de lysolecithina, continha em 0,8 cc. de soluto physiologico, 0,2 cc. de N/15 tampão de phosphato ao pH = 7,4 e 1 cc. de uma emulsão a 4% de hematias bem lavadas de cavallo.

Afim de estabelecer condições perfeitamente iguaes para a determinação da lecithinase no veneno ophidico, fixámos os seguintes factores para o exame: temperatura a 37°; pH a 7,4: tempo = 2 horas: volume do soluto: quantidade e qualidade da lecithina: quantidade e qualidade das hematias de cavallo. O pH = 7,4 e a temperatura = 37° foram escolhidos para que a experiencia se approximasse o mais possivel das condições naturaes dos humores no corpo. Pela addição de 0,2 cc. de tampão de phosphato N/15, facilmente obtem-se o pH desejado. Observa-se tambem que os teores alcançados dependem grandemente de que se use de uma boa lecithina e em emulsão recente em soluto physiologico e de que os globulos sanguineos sejam frescos (permanencia maxima de 3 dias na geladeira). E' claro, que a quantidade da lecithina addicionada, do mesmo modo que o tempo da reacção, desempenha um grande papel. Emquanto a reacção entre a lysolecithina e os globulos sanguineos, como já referimos acima, se produz quasi instantaneamente, a acção da lecithinase sobre a lecithina, e, portanto, a formação de lysolecithina, é de apparecimento variavel, por se tratar de effeito enzymatico, que depende, não só da quantidade da enzyma, como tambem do substrato presente, isto é, da concentração de lecithina existente, e duração da acção. Como já mostramos, 60 γ de lysolecithina bastam para a immediata hemolyse. Dahi termos fixado em 100 γ a quantidade de lecithina. De qualquer modo, é necessario que a suspensão de lecithina não tenha repousado muitos dias, visto que a lecithina em soluto aquoso é hydrolysada paulatinamente, dando nascimento a outros productos de desdobramento, que não a lysolecithina.

Essa limitação do prazo de repouso é tanto mais necessaria quanto já não é muito grande o excesso de lecithina empregado nas experiencias.

Denominamos *unidade de lecithinase* (*UL*) a quantidade de veneno em *gammas*, justamente necessaria para a completa hemolyse de 1 cc. da alludida mistura. Desde que o volume total, usado no processo, é sempre de 2 cc., a UL corresponde á metade da quantidade introduzida de veneno. A quantidade de UULL contida em 1 mg. de veneno é por nós denominada de *teor de lecithinase* (*TL*).

Os venenos de *Bothrops* contêm quantidades muito diminutas de lecithinase: *Bothrops jararacussu*, p. exemplo, possue apenas TL = 32; mesmo o veneno bem fresco de *Bothrops jararaca* tem apenas TL = 0,7, e quasi que praticamente não hemolysa em nosso processo experimental; pelo contrario, o TL do veneno de *Crotalus t. terrificus* é de 133.

A lecithinase é apparentemente ainda mais instavel do que a coagulase. Quando percebémos que o veneno crotalico (*C. t. terrificus*), em soluto conservado a 50°, perde o TCo na mesma proporção que o TT, concluimos que a queda do TL não occorre parallelamente; pelo contrario, pois a lecithinase é destruida mais rapidamente. A qualquer pH usado, ella já decrescia de 133 a 8, dentro de 24 horas.

O modo mais suave de atacar a neurotoxina, como já mostrámos, consiste em transformal-a por meio de cysteina(—SH). Enquanto o TT do veneno de *Crotalus t. terrificus*, depois de 4 horas de mistura com uma quantidade 20 vezes maior de cysteina(—SH), cahe até quasi a metade, o TL no mesmo tempo cahe para 20 ou = 15%.

Descripção das experiencias.

I. *Experiencias de coagulação.*

1) *Determinação do tempo de coagulação em differentes concentrações.* Curva 1 com annotação da concentração em escala logarithmica.

A. *Bothrops jararaca* — Veneno collectado no Instituto, contendo 10.1% de agua. Concentrações relativas a veneno sem agua.

γ/cc.	Co(segundos)	$\frac{1}{seg.}$.1000	γ/cc.	Co(segundos)	$\frac{1}{seg.}$.1000
1	720"	1,4	10	100"	10
2	440"	2,3	20	77"	13
3	360"	2,8	30	70"	14,3
4	295"	3,4	40	61"	16,4
5	220"	4,5	50	58"	17,3
6	195"	5,1	60	53"	18,9
7	150"	6,7	70	50"	20
8	135"	7,4	80	48"	20,8
9	120"	8,3	90	45"	22,2

B. *Crotalus t. terrificus* — Veneno fresco seccado no alto vacuo; teor de toxicidade = 2500; dissolvido em soluto de cloreto de sodio a 8,5%; diluido com agua distillada até conter 0,85% de cloreto de sodio.

20	1380"	0,7	200	170"	5,9
30	720"	1,4	300	170"	5,9
40	630"	1,6	400	170"	5,9
50	630"	1,6	500	210"	4,8
60	480"	2,1	600	180"	5,6
70	400"	2,5	700	200"	5,6
80	320"	3,1	800	270"	3,7
90	300"	3,3	900	360"	2,8
100	270"	3,7			

2) *Determinação do teor de coagulação.*

Afim de determinar, por um processo pratico, o teor de coagulação, empregámos sangue de cavallos sadios, a 100 cc. do qual foram addicionados, immediatamente após a colheita, 6 cc. de soluto de oxalato de sodio a 3%. O plasma foi conservado em temperatura ambiente durante uma hora, após a colheita; esta mostrou-se a maneira pratica de obtenção de tempos constantes de coagulação. O soluto de veneno a ser examinado (0,1 a 1 cc.) é pipetado em tubos de ensaio de 15-16 mms. de diametro e o volume, completado para 1 cc. com soluto physiologico. A cada minuto seguinte, collocam-se, em um desses tubos, 5 cc. do sangue oxalatado bem misturado, começando-se com o tubo que contém a menor concentração de veneno. Determina-se o tempo por meio de chronometro de marcação. Os tubos de ensaio são ligeiramente agitados logo após o recebimento do sangue, repetindo-se a agitação de 2 em 3 minutos, quando os globulos vermelhos começam a se depositar. Depois de 10 minutos, examina-se o primeiro tubo de ensaio, afim de verificar si o sangue já coagulou, examinando-se em seguida de minuto a minuto os outros tubos; segue-se a ordem em que foram enchidos, para se examinar a coagulação. A coagulação corresponde ao ponto exacto em que o sangue começa a deslisar no tubo inclinado, sob a forma de massa compacta. A quantidade de veneno no tubo de ensaio, em que primeiro se verifica essa coagulação, é dividida por 6, obtendo-se assim a concentração do veneno em cc., isto é, a unidade de coagulação (UCo). O numero dessas unidades coagulantes, assim determinadas em 1 mg. de veneno, é o teor de coagulação (TCo). Nas determinações do teor de coagulação referimo-nos sempre ao preparado de veneno, seccado no alto vacuo a 35° até obtenção de peso constante. Deixa-se escorrer o sangue na parede do tubo de ensaio, afim de evitar formação de espuma exaggerada, que igualmente se procura evitar na agitação.

3) *Exemplo da determinação de um teor de coagulação TCo.* — Veneno fresco de *Bothrops jararaca,* seccado no alto vacuo a 35.°, 0,1 mm. até o peso constante.

0,5 γ/cc.	—	2 γ/cc.	330"
0,6	750"	3	270"
0,7	570"	4	150"
		5	210"
0,8	490"	6	180"
0,9	515"	7	120"
1,0	435"		

A minima dose coagulante acha-se em 0,7, sendo assim o teor de coagulação = 1445.

4) *Teores de coagulação de varios venenos ophidicos.*

1)	*Crotalus t. terrificus*	TCo = 30	Veneno fresco, seccado no alto vacuo.
2)	*Crotalus atrox*	TCo = 0	Veneno amarello claro, fornecido por Afranio do Amaral (1927).
		TCo = 0	Veneno amarello claro, fornecido por Afranio do Amaral (1921).
		TCo = 0	Veneno de boa apparencia, obtido por Afranio do Amaral, em San Diego (Cal.) (1925).
3)	*Bothrops jararaca*	TCo = 1445	Veneno fresco, seccado no alto vacuo.
		TCo = 1670	(*) Veneno commum, do "stock" do Instituto.
4)	*Bothrops jararacussu*	TCo = 1670	Veneno do Instituto, reseccado em alto vacuo.
5)	*Bothrops neuwiedii*	TCo = 2000	Veneno da collecção do Instituto, reseccado em alto vacuo.
6)	*Bothrops atrox*	TCo = 3300	Veneno da collecção do Instituto, reseccado em alto vacuo.
7)	*Bothrops alternata*	TCo = 2500	Veneno da collecção do Instituto, reseccado em alto vacuo.
8)	*Bothrops cotiara*	TCo = 670	Veneno antigo, colhido no Instituto, parecendo deteriorado, reseccado no alto vacuo.

(*) E' possivel que na acção deste veneno impuro, tirado do "stock", tivesse havido interferencia bacteriana.

5) *Influencia do grau de acidez e da temperatura sobre o TCo.*

No.	Veneno	TT.	TCo	Temperatura	pH	Tempo	Resultado TT.	Resultado % do TT. orig	Resultado TCo	Resultado % do TCo orig.
5a	*Bothrops jararaca* (collecção do Instituto)	220	1670	50°	1	24 horas	33	15 %	33	2,0 %
					5	24	33	15 %	66	4,0 %
					8,7	24	33	15 %	6	0,4 %
					13	24	33	15 %	6	0,4 %
b	*Bothrops jararaca*	220	1670	37°	5	24			67	4,0 %
						96			67	4,0 %
						192			67	4,0 %
					6,15	24			125	7,5 %
						96			100	6,0 %
						192			67	4,0 %
					7	24			670	40,0 %
						96			500	30,0 %
						192			200	12,0 %
c	*Bothrops jararaca*	220	1670	25°	5	24			400	24,0 %
						96			200	12,0 %
						120			110	6,6 %
						192			50	3,0 %
					6,25	24			1000	60,0 %
						96			670	40,0 %
						120			400	44,0 %
						192			330	19,8 %
					7	24			1250	75,0 %
						96			670	40,0 %
						120			670	40,0 %
						192			450	27,0 %
					7,4	24	200	91,0 %	1500	90,0 %
						44			1250	75,0 %
						68			1110	66,5 %
d	*Crotalus t. terrificus*	2200	30	50°	1	24	670	30,4 %	10	33,3 %
						48			3	10,0 %
						72	125	5,7 %	3	10,0 %
					5	24	1670	76,0 %	30	100 %
						48			30	100 %
						72	1250	57,0 %	10	33,3 %
					8,7	24	1000	45,5 %	20	67,0 %
						48			10	33,3 %
						72	125	5,7 %	5	16,6 %
					13	24	125	5,7 %	3	10,0 %

6) *Influencia da cysteina(—SH) sobre o TCo e TT.* — Quantidade de cysteina(—SH) 20 vezes maior do que a quantidade do veneno.

No.	Veneno	TT.	TCo	Temperatura	pH	Tempo	Resultado TT.	% do TT. orig.	TCo	% do TCo orig.
6a	*Bothrops jararaca*	220	1670	25°	7,6	4 horas	50	22,7 %	67	4,0 %
						8	30	13.6 %	30	1,8 %
					7,8	20	15	6,8 %	85	5,1 %
						44			60	3,6 %
						68			40	2,4 %
b	*Crotalus t. terrificus*	2200	30	25°	7,4	30 Min.	385	16.3 %		
						55			10	33,3 %
						120	145	6,6 %	6	
						160			7,5	30,0 %
						240				25,0 %
						270	10,1	0,5 %		

II. Experiencias com lecithinase.

1) *Realização pratica da determinação do teor da lecithinase.*

a) *Emulsão de globulos sanguineos*: O sangue de cavallo normal é desfibrinado por meio de um pincel de borracha e os globulos sanguineos, separados por centrifugação. Estes são lavados 5 vezes com soluto physiologico, novamente separados e enfim empregados em emulsão de 4% para as experiencias de hemolyse.

b) *Suspensão de lecithina*: 250 mgs. de lecithina pura são agitados durante a noite com 500 cc. de soluto physiologico, resultando uma emulsão homogenea colloidal, que se mostrou estavel durante alguns dias. 0,2 cc. deste soluto (100 γ) são applicadas para cada experiencia de hemolyse.

c) Reacção: Os seguintes solutos são misturados em tubos de ensaio finos e altos, observando-se a ordem indicada:

0,2 cc. tampão de phosphato — pH 7,4.

0,05-0,6 cc. do respectivo soluto de veneno em soluto physiologico

0,2 cc. suspensão de lecithina (b)

1,0 cc. emulsão de globulos sanguineos (a)

Volume completado finalmente para 2 cc. com soluto physiologico. Todas as provas permanecem durante 2 horas na estufa a 37°. Determina-se qual o soluto completamente hemolysado. A quantidade de veneno sufficiente para a hemolyse de 1 cc. desta mistura é definida como unidade de lecithinase (UL). As seguintes determinação servem de exemplos:

1) *Teor de lecithinase do veneno de* ***Crotalus t. terrificus***: O soluto de veneno continha 100 γ de veneno de *Crotalus t. terrificus* seccado no alto vacuo. O resultado mostrava que todas as provas que continham 15 γ ou mais de veneno, estavam completamente hemolysados. A unidade de lecithinase era, portanto, de 7,5 γ e o teor de lecithinase, de 133.

2) *O teor da lecithinase do veneno de* ***Bothrops jararacussu***: A 0,2 cc. de tampão de phosphato foram addicionadas, em uma serie de tubos, quantidades crescentes de um soluto de 200 γ de veneno fresco de *B. jararacussu*, seccado, identico ao descripto acima, além de soluto de lecithina e emulsão de globulos sanguineos. Repouso durante 2 horas á temperatura de 37°. Em todos os tubos, que continham 62 γ ou mais de veneno, a mistura estava completamente hemolysada. A unidade de lecithinase era, portanto, de 31, o teor de lecithinase de 32.

3) *Teor de lecithinase do veneno de* ***Bothrops jararaca***: Da mesma maneira foram addicionadas á lecithina e á emulsão de globulos sanguineos quantidades crescentes de um soluto de veneno de *Bothrops jararaca*, que continha 10.000 γ de veneno em 1 cc. Nos tubos que continham 3000 γ ou mais de veneno, a mistura estava completamente hemolysada; em doses de mais de 6000 γ a hemoglobina se achava destruida, o soluto era de côr castanha e bastante turva. A unidade de lecithinase do veneno de *Bothrops jararaca* era, portanto, de 1,5, mas o teor da lecithinase era somente de 0,7.

4) *Influencia da cysteina sobre o teor de lecithinase do veneno de* ***Crotalus t. terrificus***: 2,65 mgs. de veneno de *Crotalus t. terrificus* foram dissolvidos com 50 mgs. de hydrochloreto de cysteina e 33 mgs. de carbonato de sodio, em 2,5 cc. de uma mistura de 3 cc. de tampão de phosphato e 7 cc. de soluto physiologico, pelo qual se fizera passar uma corrente de nitrogenio; o ar foi expellido do recipiente por nitrogenio, deixando-se o soluto fechado á temperatura ambiente. Para controlo, deixamos o mesmo soluto, porém sem hydrochloreto de cysteina e carbonato de sodio. Após 4 horas, determinamos nas duas experiencias o teor de lecithinase: o veneno tratado com cysteina mostrava a unidade de lecithinase como 50 γ sendo, pois, o teor de lecithinase de 20, enquanto o teor de lecithinase do controlo permanecia em 133.

RESUMO

Afim de medir o poder coagulante dos venenos ophidicos de maneira simples e fixal-o em numeros claros, foi estabelecida a definição de unidade de coagulação e teor de coagulação. A *unidade de coagulação* (*UCo*) é a quantidade de veneno em *gammas*, que coagula 1 cc. de uma mistura de 5 partes de sangue de cavallo e uma parte de soluto physiologico de cloreto de sodio. O *teor de*

coagulação (*TCo*) é o numero que determina quantas unidades de coagulação estão contidas em 1 mg. de um preparado de veneno seccado no alto vacuo.

Os venenos bothropicos contêm uma enzyma semelhante á trypsina que transforma a prothrombina em thrombina, do que resulta o grande poder coagulante destes venenos. O *veneno* de *Crotalus t. terrificus* não contém este *componente semelhante á trypsina,* porém somente (como, aliás, se conclue do trabalho de Eagle) um semelhante á papaina, que transforma o fibrinogenio em fibrina. Pode-se agora definitivamente provar que esta enzyma do veneno de *Crotalus t. terrificus* tambem possue as duas principaes propriedades da papaina: *a resistencia ao calor* e a de *poder ser activado por compostos —SH.*

Finalmente, foi definida a *unidade de lecithinase* (*UL*) desses venenos como sendo a quantidade de veneno em *gammas,* que hemolysa uma emulsão de hematias e lecithina com pH a 7,4, completamente, em 2 horas. O *teor de lecithinase* (*TL*) é, consequentemente, a quantidade de unidades de lecithinase contida em 1 mg.. Os teores de lecithinase dos venenos bothropicos são pequenos, em comparação com os teores de lecithinase do veneno de *Crotalus t. terrificus.*

ZUSAMMENFASSUNG

Um die Koagulations-Kraft der Schlangengifte in einfacher Weise messen und in einprägsamen Zahlen angeben zu können, wurde der Begriff der Koagulase-Einheit und des Koagulase-Wertes geprägt. Danach ist die *Koagulations-Einheit* (*KoE*) diejenige Menge Gift in gamma, die 1 ccm eines Gemisches aus 5 Teilen Pferdeblut und 1 Teil physiologischer Kochsalz-Lösung innerhalb von genau 10 Minuten zum Koagulieren bringt. Der *Koagulase-Wert* (*KoW*) ist die Zahl, die angiebt, wieviel so erhaltene Koagulase-Einheiten in 1 mg des im Hochvakuum getrockneten Giftpräparates enthalten sind.

Die Gifte der *Bothrops*-Arten enthalten ein trypsin-ähnliches Ferment, das Prothrombin in Thrombin überführt, wodurch die starke Koagulations-Förderung dieser Gifte hervorgerufen wird. Das Gift von *Crotalus t. terrificus* enthält diese trypsin-ähnliche Komponente nicht, sondern nur, wie schon aus der Arbeit von Eagle hervorgeht, eine papain-ähnliche, die Fibrinogen in Fibrin verwandelt. Es konnte nun einwandfrei gezeigt werden, dass dieses Ferment des *Crotalus t. terrificus*-Giftes auch die zwei hervorstechendsten Eigenschaften des Papains besitzt: seine Hitzebeständigkeit und seine Aktivierbarkeit durch -SH-Verbindungen.

Es wurde weiterhin die *Lecithinase-Einheit (LE)* der Gifte als diejenige Menge Gift in gamma definiert, die innerhalb von 2 Stunden eine bestimmte, auf pH 7,4 eingestellte Lecithin-Blutkörperchen-Aufschwemmung vollkommen hä-

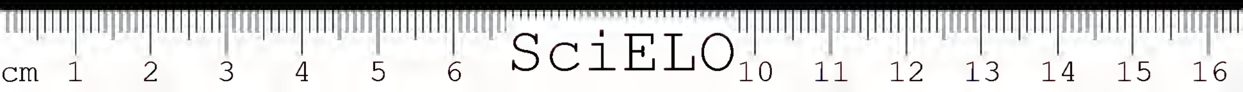


molysiert. Der *Lecithinase-Wert (LW)* ist dann die Menge von Lecithinase-Einheiten im mg.. Die Lecithinase-Werte der Gifte von *Bothrops*-Arten sind niedrig im Vergleich zu den Lecithinase-Werten des *Crotalus t. terrificus*-Giftes.

BIBLIOGRAPHIA

1) *Eagle, H.* — J. Exper. Med. 65:613 1937.

(Trabalho da Secção de Chimica do Instituto Butantan, recebido em dezembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).





612.3143:598.122

NOVOS ESTUDOS IMMUNOLOGICOS SOBRE A SUBSTANCIA COAGULANTE DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACA*

POR

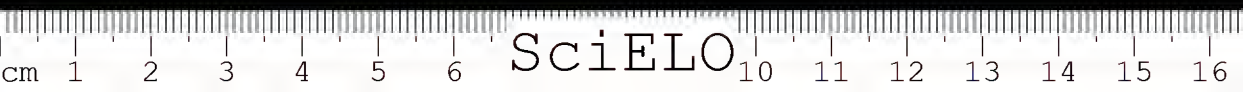
D. VON KLOBUSITZKY & P. KÖNIG

Em publicações anteriores escrevemos sobre a fixação da substancia coagulante, obtida da secreção natural da glandula venenifera da *Bothrops jararaca*, como tambem sobre a Bothropotoxina por meio de differentes antivenenos (1,2,3,4). Dos nossos resultados conclue-se que os referidos componentes do veneno assim purificados se fixam por outras regras e proporções, como era de esperar á base da fixação do veneno natural. Conforme communicamos em continuação a estas pesquisas, resolvemos realizar immunizações com estas substancias e examinar a capacidade de fixação do sôro dos animaes empregados.

O objecto das pesquisas que relataremos agora é a determinação das qualidades dos sôros, que são obtidos por meio de immunização com uma fracção coagulante do veneno natural da serpente mencionada.

O soluto usado, contendo 0,85% NaCl, tinha as seguintes caracteristicas, ao ser iniciada a immunização: dose minima letal (D.M.L.) — 1,6 cc. (D.M.L. é a dose minima sufficiente para matar, por via intravenosa, um pombo adulto, em 20 minutos); 1 cc. do soluto coagulou 5 cc. de sangue de cavallo, contendo 0,3% $(COONa)_2$, em 2'20. "A quantidade correspondente á D.M.L. provocou a coagulação da mesma quantidade de sangue oxalatado em 1'50": o soluto foi empolado, conservado constantemente no frigo a 4°C e as empolas necessarias á immunização foram retiradas da geladeira 1-2 horas antes da inoculação. Apezar deste modo de conservação, o soluto mostrou actividade bem differente após 8 semanas, isto é, ao fim da immunização: sua D.M.L. subiu a 3,5 cc.; o tempo de coagulação por 1cc. foi de 7' e pela D.M.L., de 1'20". O nitrogenio do soluto era de 2,4 mg % (micro-Kjeldahl).

Afim de poder comparar o poder coagulante dos varios solutos de veneno, isto é, das substancias coagulantes purificadas, escolhemos uma dose que denomi-námos de unidade, assim definida: unidade coagulante é a quantidade minima



que em 1 cc. é sufficiente para coagular completamente 5 cc. de sangue oxalatado de cavallo na temperatura ambiente (20-22°-C), em 5 minutos (*). No inicio da immunização, o soluto continha 3,5 e, no fim, 1,6 unidades coagulantes por 1 cc., razão pela qual tomámos como base, em nossas posteriores experiencias os valores medios. Desta maneira resultou que todos os animaes receberam, em 77,4 cc. de soluto inoculado, 162 unidades coagulantes e 30 D.M.L. Applicando veneno natural na immunização, a proporção entre a D.M.L. e a unidade coagulante seria de 1:1,5, ao passo que o mesmo em nosso caso foi de 1:5,4.

Para a immunização, escolhémos uma cabra (C 1) e um bode (C 2) nos quaes inoculámos o soluto por via subcutanea. Como este, ao nosso ver, é o primeiro caso, em que se usou veneno de cobra fraccionado e livre de corpos albuminosos typicos, achamos necessario relatar minuciosamente o curso da immunização.

Data	Quantidade inoculada	Cabra 1 ♀		Cabra 2 ♂	
		temperatura media diaria	peso	temperatura media diaria	peso
13.8	0,2	38,1°C	18 kilos	38,5°C	27 kilos
16.8	0,4	38,1		38,5	
19.8	0,6	38,0		38,1	
22.8	0,9	37,8		38,4	
23.8			19		28
25.8	1,2	38,3		38,5	
28.8	1,5	37,5		37,6	
30.8			17		25
31.8	1,8	38,2		37,9	
3.9	2,2	38,4		38,5	
7.9	2,7	38,0		38,2	
10.9	3,2	37,8		37,9	
13.9	3,7	38,1	22,5	38,2	25
15.9	4,5	38,3		38,4	
18.9	5,0	38,0		38,1	
21.9	5,5	38,1		38,2	
24.9	6,0	38,4		38,4	
27.9			18		28
28.9	7,0	38,2		37,8	
30.9	7,0	38,2		38,0	
3.10	8,0	38,2		38,0	
4.10			20		30
4.10	Exame de sangue				
5.10	8,0	38,1		38,4	
8.10	8,0	38,1		38,3	
9.10	Exame de sangue				

(*) Consideramos coagulação completa o ponto attingido pelo sangue ao formar no tubo u'a massa dura-

METHODO

As misturas obtidas com os solutos de veneno natural e com os fraccionados mais sôro foram postas na estufa durante ½ hora, antes da applicação. A fixação da substancia neurotoxica foi determinada por meio de injecção das misturas na veia asillar de pombos de 300-350 gms. de peso, escolhendo as quantidades de tal modo, que correspondiam pelo menos a uma D.M.L.. Afim de determinar a capacidade de fixação de referencia á qualidade coagulante, foram postos 5 cc. de sangue oxalatado de cavallo nas misturas usadas para injecção e medido com um relogio de parada o tempo de coagulação completa. O sangue oxalatado provinha do mesmo cavallo em descanso. A respeito das oscillações diarias do tempo de coagulação, daremos nos varios quadros somente os resultados de pesquisas realizadas no mesmo dia e com a mesma amostra de sangue.

Parte experimental

Em primeiro logar, determinámos a capacidade neutralizante do sôro caprino em relação ao veneno natural. Empregámos para esse fim dois venenos differentes de *Bothrops jararaca.* Uma amostra de veneno, denominada veneno *a,* o qual foi colhido bem fresco e seccado; outra, chamada veneno *b,* o qual provinha de nosso "stock" accumulado durante annos. As caracteristicas dessas duas amostras de veneno podem-se resumir no seguinte:

Veneno *a*

D. M. L. = 0,04 mg.
tempo de coagulação por D. M. L. = 4,1 D. M. L. = 1,4 unidade coagulante

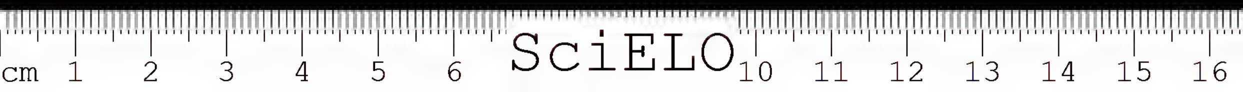
Veneno *b*

D. M. L. = 0,13 mg.
tempo de coagulação por D. M. L. = 3'30" 1 D. M. L. = 2 unidades coagulantes.

I. *Experiencia com solutos de venenos naturaes.*

1. Experiencia com veneno *a* e sôro C 1.

O soluto de veneno applicado continha por cc. 0,04 mgs., isto é, um conteudo secco correspondente a 1 D. M. L.



a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
I	4 cc.	2 cc. dil. 1:10	1,5 cc.	morte após 27'
II	4 cc.	4 cc. dil. 1:10	2,0 cc.	symptomas leves, sobrevida
III	4 cc.	4 cc. dil. 1:8	2,0 cc.	nenhum symptoma
IV	4 cc.	2 cc. não dil.	não foram injectadas	
V	4 cc.	4 cc. não dil.		

b) Fixação do poder coagulante.

1,5 cc. da mistura I produzem coagulação em 4'
2,0 cc. " " II " " " 6,40"
2,0 cc. " " III " " " 6,50"
1,5 cc. " " IV " " " 8'
2,0 cc. " " V " " " 21'

2. Experiencias com veneno *a* e sôro C 2.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
VI	4 cc.	4 cc. dil. 1:17	2 cc.	morte após 8'
VII	4 cc.	4 cc. dil. 1:15	2 cc.	symptomas leves, sobrevida
VIII	4 cc.	4 cc. dil. 1:12	2 cc.	nenhum symptoma
IX	4 cc.	4 cc. dil. 1:10	2 cc.	nenhum symptoma
X	4 cc.	4 cc. dil. 1:5	não foi injectada	

b) Fixação do poder coagulante.

2 cc. da mistura VI produzem coagulação em 4'10"
2 cc. " " VII " " " 4'30"
2 cc. " " VIII " " " 4'40"
2 cc. " " IX " " " 4'40"
2 cc. " " X " " " 8'20"

3. Experiencias com veneno *b* e sôro C 1.

O soluto de veneno applicado continha por cc. 0,1 mg.; a D. M. L. era de 1,3 cc.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
XI	5,2 cc.	0,8 cc. dil. 1:1	1,5 cc.	morte após 15'
XII	5,2 cc.	1,2 cc. dil. 1:1	1,6 cc.	symptomas graves, sobrevida
XIII	5,2 cc.	1,6 cc. dil. 1:1	1,7 cc.	symptomas leves, sobrevida
XIV	5,2 cc.	2,4 cc. dil. 1:1	1,9 cc.	nenhum symptoma
XV	5,2 cc.	2,0 cc. não dil.	não foi injectada	

b) Fixação do poder coagulante.

1,5 cc. da mistura XI produzem coagulação em 7'40"
1,6 cc. " " XII " " " 6'
1,7 cc. da mistura XIII produzem coagulação em " 3,20"
1,9 cc. " " XIV " " " " 3,30"
1,8 cc. " " XV " " " " 8,50"

4. Experiencias com veneno *b* e sôro C 2.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
XVI . . .	5,2 cc.	0,4 cc. dil. 1:2	1,4 cc.	morte após 18'
XVII . . .	5,2 cc.	0,8 cc. dil. 1:2	1,5 cc.	nenhum symptoma
XVIII . . .	5,2 cc.	1,6 cc. dil. 1:2	não foi injectada	

b) Fixação do poder coagulante.

1,4 cc. da mistura XVI produzem coagulação em 2,40"
1,5 cc. " " XVII " " " 2,40"
1,7 cc. " " XVIII " " " 2,45"

II. *Experiencias com um soluto fraccionado de veneno, DB.*

O soluto *DB* foi obtido por meio de precipitação, seguida de adsorpção da fracção de globulinas. Como descrevemos o methodo de fabricação e purificação em outro trabalho (5), mencionaremos aqui somente que a fracção de globulinas foi obtida por meio de precipitação com $(NH_4)_2SO_4$ até a meia saturação, e que a adsorpção foi feita por meio de $Cr(OH)_3$. Ao soluto dialysado foi juntado NaCl até attingir 0,9%. Este soluto mostrou-se, do mesmo modo que o applicado para a immunização, coagulante em alto grau e menos neurotoxico do que os solutos de veneno natural, (*) tendo as seguintes caracteristicas na diluição de 1:2,5:

D. M. L. = 0,8 cc.

Tempo de coagulação por cc. = 1'25"
Tempo de coagulação por D. M. L. = 1,35"
1 D. M. L. = 6 unidades coagulantes.

1. Experiencias com o soluto *DB* e sôro C1.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
XIX	3,2 cc.	4 cc. dil. 1,5:	1,8 cc.	morte após 13'
XX	3,2 cc.	2 cc. não dil.	1,3 cc.	nenhum symptoma

b) Fixação do poder coagulante.

1,8 cc. da mistura XIX produzem coagulação em 3,45"
1,3 cc. " " XX " " " 1,15"

(*) Não foi possivel applicar o soluto usado para a immunização nas experiencias de fixação, devido á diminuição de sua actividade neurotoxica. Quando diminuimos o soluto, por meio do ultrafiltração a 1/4 de seu volume original, verificámos, talvez devido á adsorpção desigual na membrana ultrafiltrante, que houve uma modificação na proporção actividade neurotoxica: poder coagulante, o que tornou o soluto semelhante ao veneno natural. Assim:

a) antes da ultrafiltração: D.M.L. = 3,5 cc.; tempo de coagulação por cc. = 2'20"; tempo de coagulação por D.M.L. = 1,20";

b) depois da ultrafiltração: D.M.L. = 1,2 cc.; tempo de coagulação por cc. = 4'; tempo de coagulação por D.M.L. = 3'40".

2. Experiencias com o soluto DB e sôro C2.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
XXI . . .	3,2 cc.	4 cc. dil 1:5	1,8 cc.	morte após 9'
XXII . . .	3,2 cc.	2 cc. não dil	1,3 cc.	morte após 13'
XXIII . . .	3,2 cc.	4 cc. não dil.	1,8 cc.	nenhum symptoma

b) Fixação do poder coagulante.

1,8 cc. da mistura XXI produzem coagulação em 3'
1,3 cc. " " XXII " " " 6'
1,8 cc. " " XXIII " " " 8'

III. *Experiencia com veneno de Cascavel.*

No decurso de nossas pesquisas anteriores, pudemos determinar que o sôro anti-crotalico, obtido por immunização com o veneno natural de Cascavel sul-americana (*Crotalus terrificus terrificus*), neutraliza, do mesmo modo que o sôro anti-bothropico especifico, a neurotoxina purificada da *Bothrops jararaca,* embora a capacidade de fixação do sôro anti-crotalico seja bem menor em relação ao veneno natural da *Bothrops jararaca* (3). Pudemos tambem mostrar que o veneno de Cascavel possue um certo poder coagulante e que a substancia coagulante nelle contida é fixada pelo sôro anti-bothropico (4). Afim de completar a determinação, procedemos a um exame do poder de fixação do nosso sôro caprino em ligação ao veneno natural de Cascavel. Em relação á alta actividade neurotoxica e ao poder coagulante relativamente pequeno deste veneno, as duas especies de fixação foram determinadas em dois solutos de concentrações differentes. Para experiencias de coagulação applicamos um soluto de 1% e, para o exame da fixação da neurotoxina, uma diluição de 1:2000 do mesmo.

O quadro seguinte mostra o poder coagulante:

1 cc. do soluto original produz coagulação em 0,55"
1 cc. " " " diluido a 1:1 produz coagulação em 1'15"
1 cc. " " " " a 1:4 " " " 2'
1 cc. " " " " a 1:8 " " " . 4'
1 cc. " " " " a 1:16 " " " 7'
1 cc. " " " " a 1:32 " " " 10,30"

A D. M. L. foi determinada igualmente em pombos por injecção intravenosa; fixamos, porém, o tempo de observação em 24 horas, devido ao lento desenvolvimento da actividade do veneno. 0,2 cc. do soluto original diluido a 1:2000, correspondentes a 0,001 mg. de substancia secca: nenhum symptoma. 0,3 cc. da diluição mencionada, correspondentes a 0,0015 mg. de substancia secca: morte. 0,4 cc. da diluição, correspondentes a 0,002 mg. de substancia secca: morte.

Por conseguinte, na concentração por nós applicada, a D. M. L. era de 0,3 cc., isto é, 0,0015 mg..

1. Experiencias com sôro C 1.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	soluto de veneno	sôro		
XXIV . . .	0,6 cc.	3 cc. não dil.	1,8 cc.	nenhum symptoma
XXV . . .	0,6 cc.	2 cc. não dil.	1,3 cc.	morte
XXVI . . .	0,6 cc.	2 cc. dil. 1:1	1,3 cc.	morte

b) Fixação do poder coagulante.

Para esta experiencia diluimos o soluto original a 1:6. 1 cc. dessa diluição produziu coagulação em 2,50" e 0,5 cc., diluido com 0,5 cc. NaCl (sol. physiol), em 4,50". Desta e de determinações anteriores concluimos que 1 D. M. L. corresponde a 0,0019 de unidade coagulante.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Volume usado	Coagulação em:
	Sol. original dil. a 1:6	sôro		
XXVII	1 cc.	1 cc. não dil.	1 cc.	3'15"
XXVIII	1 cc.	1 cc. dil. 1:1	1 cc	3'50"
XXIX	1 cc.	1 cc. dil 1:2	1 cc.	3'50"
XXX	1 cc.	1 cc. dil. 1:5	1 cc.	4'
XXXI	1 cc	1 cc. dil. 1:8	1 cc.	4'40"
XXXII	1 cc.	1 cc. dil. 1:10	1 cc.	4'20"
XXXIII	1 cc.	1 cc. dil. 1:20	1 cc.	3'15"

2. Experiencias com sôro C 2.

a) Fixação da actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Quantidade inoculada	Resultado
	Sol. original dil. a 1:2000	sôro		
XXXIV	0,6 cc.	3 cc. não dil.	1,8 cc.	morte
XXXV	0,6 cc.	2 cc. não dil.	1,3 cc.	morte
XXXVI	0,6 cc.	2 cc. dil. 1:1	1,3 cc.	nenhum symptoma

b) Fixação do poder coagulante.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa		Volume usado	Coagulação em:
	Sol. original dil. a 1:6	sôro		
XXXVII . . .	1 cc.	1 cc. não dil.	1 cc.	3'5"
XXXVIII . . .	1 cc.	1 cc. dil. 1:1	1 cc.	4'10"
XXXIX . . .	1 cc.	1 cc. dil. 1:2	1 cc.	4'
XL . . .	1 cc.	1 cc. dil 1:5	1 cc.	4'
XLI . .	1 cc.	1 cc. dil. 1:8	1 cc.	4'30"
XLII . . .	1 cc.	1 cc. dil. 1:10	1 cc.	4'40"
XLIII . . .	1 cc.	1 cc. dil. 1:20	1 cc.	3'15"

IV *Experiencias para controlo com sôro anti-bothropico.*

Afim de comparar o poder neutralizante do nosso sôro caprino com o do sôro anti-bothropico commum, obtido por immunização com veneno natural, repetimos todas as experiencias com um sôro anti-bothropico concentrado monovalente, fabricado neste Instituto para fins therapeuticos. Este sôro neutralizava por cc. 2,2 mgs. de veneno natural da *Bothrops jararaca*. Os resultados dessas pesquisas são resumidos em seguida:

Capacidade neutralizante do sôro anti-bothropico.

a) Actividade neurotoxica.

Denominação da mistura	Mistura posta na estufa ..	Quantidade inoculada	Resultado
XLIV . . .	4 cc. veneno *a* + 4 cc. sôro dil. 1:50	2 cc.	symptomas leves, sobrevida
XLV . . .	5,2 cc. » *b* + 0 8 cc. » » 1:10	1,5 cc.	symptomas leves. sobrevida
XLVI . . .	5,2 cc. » *b* + 1,2 cc. » » 1:10	1,6 cc.	nenhum symptoma.
XLVII . . .	3,2 cc. *DB* dil. 1:2,5 + 4 cc. » » 1:25	1,8 cc.	symptomas graves, sobrevida
XLVIII . . .	3,2 cc. *DB* dil. 1:2,5 + 2 cc. » » 1:10	1,3 cc.	nenhum symptoma.
XLIX . . .	3,2 cc *DB* dil. 1:2,5 + 4 cc. » » 1:10	não foi	injectada.

b) Poder coagulante.

2 cc.	da	mistura	XLIV	produzem	coagulação	em 51'
1,5 cc.	"	"	XLV	"	"	" 14'
1,6 cc.	"	"	XLVI	"	"	" 50'
1,8 cc.	"	"	XLVII	"	"	" 20'
1,3 cc.	"	"	XLVIII	"	"	" 60'
1,8 cc.	"	"	XLIX	"	"	" 90'

Discussão dos resultados.

Um ligeiro exame dos quadros anteriores mostra-nos que os sôros obtidos de caprinos infectados com as fracções fixaram bem menos o poder coagulante do veneno natural como tambem do soluto fraccionado *DB*, do que o anti-sôro obtido por immunização com veneno natural. O seguinte quadro mostra os respectivos dados de comparação.

		Veneno *a*	Veneno *b*	Soluto *DB*
Sôro anti-bothropico	D.M.L. fixada por cc. . . .	55	55	30
	1 D.M.L. + quantidade de sôro neutralizante retarda a coagulação por	47'	10'30"	18'
C 1	D.M.L. fixada por cc. . . .	10	5	2
	1 D.M.L. + quantidade de sôro neutralizante retarda a coagulação por	2'40"	0'	0'
C 2	D.M.L. fixada por cc. . . .	15	15	1
	1 D.M.L. + quantidade de sôro neutralizante retarda a coagulação por	0'	0'	2'30"

Conforme se vê claramente por este quadro, o sôro C 2 foi excepcionalmente activo, quanto á sua capacidade de fixação neurotoxica, apezar das pequenas quantidades de D. M. L. usadas, pois o sôro anti-bothropico era concentrado, enquanto que os sôros caprinos não o eram. O poder neutralizante dos dois sôros caprinos relativamente ao poder coagulante era pequeno. Seria falho tomar as unidades coagulantes contidas em 1 D. M. L. como base de comparação, porque as experiencias estão provando que a quantidade de sôro, que neutraliza o effeito neurotoxico estrictamente correspondente á unidade coagulante, não augmenta o tempo de coagulação de maneira correspondente. Desse quadro parece poder-se concluir que o sôro C 1, que neutralizava menos D. M. L., era mais activo relativamente á substancia coagulante, do que o sôro C 2, estabelecendo-se assim, uma proporção invertida entre a capacidade de fixação em relação ao componente neurotoxico e o poder coagulante. Si isto é um facto não se pode affirmar com certeza, á base das pesquisas realizadas, porque para isso seria necessario fazer experiencias seriadas com diluições bem differentes. Essa duvida ainda augmenta em vista de parecerem os sôros caprinos, em maiores concentrações, apressar a coagulação (Vide as misturas XIII, XIV, XVI, XVII, XVIII). Aqui queremos assignalar que, comparando-se as quantidades de sôro necessarias para augmentar o tempo de coagulação de 1 D. M. L. por um certo tempo, digamos 4 minutos, os dois sôros caprinos se mostram equivalentes conforme o quadro seguinte:

Quantidades de sôro, que augmentam o tempo de coagulação de 1 D. M. L. em 4'.

Sôro anti-bothropico		C 1	C 2
Veneno *a*	0,01 cc.	0,5 cc.	0.2 cc.
Veneno *b*	0,02 cc.	0,4 cc.	0,4 cc.
Sol. *DB*	0.04 cc.	1,0 cc.	0,8 cc.

Até agora só se pode affirmar com certeza que o sôro immune obtido por meio de immunização com uma dessas fracções de veneno, que têm maior actividade coagulante e poder neurotoxico mais baixo do que o veneno natural, é bem mais fraco em relação ao poder coagulante do que o antisôro por meio de immunização normal, isto é, por veneno natural. Esse resultado se poderia explicar facilmente, considerando-se a substancia coagulante como uma haptena, isto é, uma substancia que, separada do componente neurotoxico, não possue caracter antigenico. A pequena capacidade neutralizante dos nossos sôros caprinos, observada relativamente á substancia coagulante, pode ser atribuida á interferencia de componentes activos existentes em estado natural no soluto applicado para a immunização. O caracter de haptena da substancia coagulante explicaria tambem o facto de os sôros caprinos terem um effeito visivelmente menor em relação ao soluto fraccionado *DB* do que relativamente ao veneno natural. No decurso das experiencias de immunização, sobre as qûaes falaremos mais tarde, procuraremos verificar si a substancia neurotoxica purificada do veneno natural, a bothropotoxina, que, conforme sabemos, não possue poder coagulante algum, se comporta á maneira de uma haptena.

A's experiencias com veneno de cascavel temos muito pouco a acrescentar. Os resultados referentes ao poder coagulante (1,5 cc. de sôro não retarda a coagulação) confirmam a nossa affirmação anterior de que a substancia coagulante do veneno de Cascavel deve ser differente da substancia coagulante do veneno bothropico. O effeito coagulante mais rapido, observado nos soros caprinos (Vide as misturas XXVII, XXVIII, XXIX, XXX) pode ser devido, de um lado, ao pequeno poder anti-coagulante deste veneno, e, de outro lado, ao calcio addicionado aos soros. Em experiencias em que addicionamos 5 cc. de sangue equino normal a 2 cc. de soros caprinos não diluidos ou diluidos a 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, não notámos a influencia dos soros caprinos sobre o tempo de coagulação.

RESUMO

Dois soros caprinos obtidos por meio de immunização com um soluto purificado, obtido por fraccionamento e seguido de adsorpção do veneno natural da

Jararaca (*Bothrops jararaca*), por meio de $Cr(OH)_3$ demonstraram a seguinte capacidade de fixação, apezar de possuir esse soluto, em comparação com o veneno natural, maior poder coagulante e menor actividade neurotoxica:

1. Os sôros caprinos neutralizaram os componentes neurotoxicos do veneno natural e uma fracção coagulante obtida desse veneno, bem mais do que o poder coagulante do mesmo.

2. O poder coagulante do veneno da Cascavel (*Crotalus terrificus*) não foi neutralizado pelos soros.

A' base desses resultados de nossas pesquisas, parece que os componentes coagulantes do veneno de serpente, separados de sua fixação natural, se devem considerar como haptenas.

ABSTRACT

Two sera obtained from goats immunized with a solution of *Bothrops jararaca* venom previously purified by means of fractionation and adsorption with $Cr(OH)_3$ showed a certain capacity of fixation although the purified antigen used possessed a higher coagulating power and a lower neurotoxic activity than the original poison:

1. They neutralized more completely both the neurotoxic constituents of the natural poison (*Bothrops jararaca*) and the coagulating fraction extracted from it than its original coagulating activity.

2. They failed to neutralize the original coagulating activity of the rattlesnake poison (*Crotalus terrificus*).

In the light of these findings it seems that the coagulating constituents of those snake poisons, after separation from their natural binding substances, should be considered as haptens.

BIBLIOGRAPHIA

1. *von Klobusitzky, D. & König,* P. — Mem. Inst. Butantan **10**:233.1937 *et* Arch. f. exp. Path. & Pharmakol. **181**:387.1936.
2. *von Klobusitzky, D. & König, P.* — Mem. Inst. Butantan **10**:245.1937 *et* Zschr. f. Immunitätsf. **89**:145.1936.
3. *von Klobusitzky, D. & König, P.* — Mem. Inst. Butantan **10**:205.1937 *et* Zschr. f. Immunitätsf. **87**:202.1936.
4. *von Klobusitzky, D. & König, P.* — Mem. Inst. Butantan **10**:217.1937 *et* Zschr. f. Immunitätsf. **87**:330.1936.
5. *von Klobusitzky, D. & König, P.* — Mem. Inst. Butantan *et* Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. a ser publicado.

(Trabalho da Secção de Physico-Chimica do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937; a ser publicado tambem em alemão in Zschr. f. Immunitätsf. Dado á publicidade em dezembro de 1937).


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

614.478

CONCENTRAÇÃO DA ANTITOXINA TETANICA POR MEIO DE ADSORPÇÃO

POR

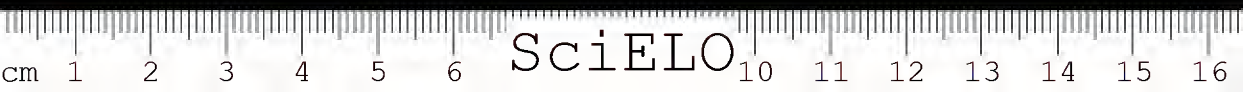
D. von KLOBUSITZKY

A purificação e concentração das antitoxinas é um problema que, além de grande importancia theorica, possue tambem um valor puramente pratico. Comprehende-se, por isso, que actualmente as pesquisas sobre a purificação das antitoxinas sejam realizadas, não só pelo methodo chimico classico, introduzido por Tizzoni e Cattoni (1), como tambem por meio de processos physicos, biologicos ou enzymologicos.

No estado actual da questão, os methodos physicos, e principalmente o que se baseia no emprego de varios meios de adsorpção, são os mais estudados. Experiencias sobre adsorpção da antitoxina diphterica já foram feitas por Aronson (2), no seculo passado e, ha mais ou menos 25 annos, por Marshall e Walker (3), sem que houvessem despertado maior interesse. Todavia, os trabalhos fundamentaes de Willstätter e de sua escola, sobre a purificação e o insulamento dos fermentos pelos methodos de adsorpção, obtiveram tão grande successo, que os pesquisadores começavam de novo a applicar aquelles processos no estudo das toxinas e antitoxinas bacterianas

Os methodos especiaes adoptados para este fim particular basciam-se no facto de ser possivel retirarem-se do soro as antitoxinas por meio de varios hydroxydos de aluminio ou caolim commercial, de tal maneira que, depois de uma eluição conveniente, as antitoxinas ficam por fim em soluto aquoso. As technicas elaboradas (4-7), principalmente para a purificação da antitoxina diphterica, têm, porém, na maioria dos casos a grande desvantagem de implicarem a determinação das condições optimas de adsorpção para cada caso; ainda assim, o rendimento dellas é muito variavel.

Baseando-nos em experiencias por nós realizadas em 1933, nas quaes tentámos insular a antitoxina tetanica, inclinamo-nos a acreditar que a adsor-



pção é relativamente facil e se realiza de modo bastante regular, mas a segunda parte do processo, isto é, a eluição da antitoxina é que traz muito desperdicio e não decorre com regularidade, de sorte que o rendimento final mostra grandes oscillações.

Depois de ter verificado que a antitoxina não perde a actividade dentro de 8 dias entre pH 3,8 e 9,3, mesmo quando guardada na temperatura ambiente, iniciámos as experiencias de adsorpção por meio de caolim.

Experiencias

Damos a seguir a descripção duma das 16 tentativas que fizemos. A experiencia escolhida foi a que deu o melhor rendimento entre todas e foi levada a effeito por meio de uma technica que se baseia, em sua essencia, no methodo de Kligler e Olitzki. A modificação principal, por nós introduzida, consiste no emprego de um pH baixo para a adsorpção e dum meio bastante alcalino para a eluição.

Technica: Dilue-se o soro antitetanico com tres volumes de agua e juntam-se a cada 100 cc. do liquido 25 gs. de caolim e o sufficiente de HNO_3 N/1 para obter o pH=3,8. Depois, agita-se bem durante 4 horas á temperatura do ambiente. Centrifuga-se o caolim e despreza-se o liquido sobrenadante, que em regra não possue mais do que 20% do poder antitoxico original. Junta-se ao caolim, conforme o methodo de Fedor e seus collaboradores, agua com 1% de glycocolla e NaOH N/1, até que o pH do liquido seja = 9,4. O volume desta agua glycocollada deve ser igual ao do soro diluido. Agita-se o caolim a 37°C durante 6 horas, centrifugando-se em seguida. Ajusta-se o pH do liquido sobrenadante a=7,4 e reduz-se o seu volume á vontade pela ultra-filtração através duma membrana de collodio a 10% em acido acetico glacial. O poder antitoxico, bem como o conteudo em N_2, são verificados em todas as phases do processo, este ultimo pelo micro-methodo de Kjeldahl (*).

Os resultados destas verificações podem ser resumidos como segue: 200 cc. de soro tetanico, de 100 unidades antitoxicas por cc., forneceram por este processo 8 cc. de antitoxina purificada com um poder antitoxico de 1.400 unidades por cc.. O rendimento total era portanto de 56%. O soro diluido com 600 cc. de agua destillada continha 3,17 mgm. de N_2 por cc., de modo que a 1 mgm. do N_2 correspondiam 7,9 unidades antitoxicas. Depois de adsorpção, o volume do liquido sobrenadante era de 650 cc.. Este liquido doseava por cc. mais do que uma unidade e menos do que 5 unidades antitoxicas e continha, na mesma quantidade, 0,64 mgm. de N_2; portanto, tomando-se como poder

---

(*) Os doseamentos do poder antitoxico foram feitos, em parte, pelo nosso collega, dr. Flavio da Fonseca e, em parte, pela auxiliar, d. Chloé de Lima, aos quaes agradecemos o valioso auxilio.



antitoxico 3 unidades por cc., a 1 mgm. de N_2 correspondiam 5 unidades. No producto final encontrámos 1,55 mgm. de N_2 por cc., de modo que 1 mgm. de N_2 correspondia a 903 unidades antitoxicas. A concentração que conseguimos attingir era, neste caso, calculada em relação ao nitrogenio=114 vezes.

DISCUSSÃO

Deixando de lado o valor puramente theorico desta experiencia e occupando-nos somente com o seu significado pratico, devemos confessar que — pelo menos por enquanto — os methodos de adsorpção não podem ser considerados adaptaveis para fins industriaes. A causa disto reside principalmente na grande irregularidade da eluição. O rendimento das nossas 16 experiencias variou entre 8% e 56%. Até agora, não foi publicada technica alguma de eluição que desse regularmente um rendimento acceitavel para fins praticos. *As experiencias em geral, inclusive as nossas, mostram que a adsorpção das antitoxinas não é selectiva, isto é, que as antitoxinas são adsorvidas juntamente com as proteinas e só a eluição nos dá a possibilidade de separal-as.* A este respeito, as antitoxinas bacterianas comportam-se de modo perfeitamente igual ao do veneno de *Bothrops jararaca* (8).

Uma outra desvantagem do emprego dos methodos de adsorpção para fins industriaes é a necessidade de forte diluição. Partindo, por exemplo, apenas de 10 litros de soro, já temos que centrifugar e ultrafiltrar (ou destillar no vacuo) mais ou menos 40 litros de liquido, o que torna muito dispendioso o processo na pratica.

Por fim, devemos levar em consideração que, usando-se os methodos de adsorpção, o preparo leva muito mais tempo do que empregando-se a concentração pelos methodos communs. O phenomeno de adsorpção é influenciado por circunstancias que não podem ser determinadas e fixadas previamente com a exactidão necessaria, de modo que o doseamento do poder antitoxico é indispensavel em cada phase da manipulação.

RESUMO

Em 16 tentativas feitas para concentrar antitoxina tetanica por meio de adsorpção por caolim foram observados os seguintes factos:

a) O titulo da antitoxina tetanica não fica alterado entre o pH=3,8 e 9,3, mesmo quando foi ella conservada 8 dias na temperatura ambiente;

b) A adsorpção por caolim ao pH=3,8 realiza-se de modo bastante regular, reduzindo-se de mais ou menos 80% o poder antitoxico do soro;



c) Esta adsorpção não é selectiva, visto que todas as proteinas ficam tambem adsorvidas;

d) E' possivel separar das proteinas a antitoxina pelo methodo de Fedor ao pH= ± 9,3, mas esta separação não é regular e seu rendimento é muito variavel

No decurso duma das concentrações feitas o rendimento em antitoxina foi de 56% e o augmento do poder antitoxico do producto, calculado em relação ao nitrogenio, foi de 144 vezes. Do ponto de vista pratico, pode-se concluir que os methodos de adsorpção não são por enquanto applicaveis á concentração de antitoxinas em larga escala.

ABSTRACT

Sixteen attempts made to concentrate tetanus antitoxin by means of adsorption through kaolin have brought out the following facts:

a) between pH=3,8 and pH=9,3, the titer of the antitoxin did not loose potency even after keeping it for 8 days at room temperature;

b) adsorption through kaolin at pH=3,8 takes place rather regularly and the antitoxic titer of the serum decreases of about 80%;

c) this adsorption is not selective since all the proteins are also adsorved;

d) it is possible to separate the antitoxin from the proteins by Fedor's method at pH=9,3 ±; that separation, however, is not regular and its yield is very variable.

In the course of one of the concentrations thus performed the antitoxin yield equalled 56%, whilst the antitoxin titer increased 114 times as calculated from the nitrogen content. The conclusion to be drawn from these experiments is that the adsorption methods are not as yet applicable to the large scale concentration of antitoxins.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Tizzoni, G. & Cattoni* — Riforma Medica :102.1891.
2. *Aronson, H.* — Berl. klin. Wschr. :625.1893.
3. *Marshall, J. & Walker, H. W.* — J.Amer.Chem.Soc. 35:825.1913.
4. *Eisler, M. & Spiegel-Adolf,* M. — Biochem.Szchr. 24:28.1929.
5. *Tasman, A. & Pondman, A. B. F.* — Zchr. f. Immunitätsforsch. 82:245.1931.
6. *Schmidt, S.* — C.R.Soc.Biol. 103:1926.1929; 106:308.1931; 107:327.1931.
7. *Kligler, I. J. & Olitzki, L.* — Brit.J.Exper.Path. 12:69,172,393.1931; 13:237.1932.
8. *von Klobusitzky, D. & König, P.* — Mem. Inst. Butantan 10:223.1937 *et* Arch. exper. Pathol. Pharmakol. 181:387.1936.

(Trabalho da Secção de Physico-chimica do Instituto Butantan, apresentado ao 3.° Congresso de Chimica realizado em julho de 1937 no Rio de Janeiro; a ser publicado tambem em inglês in Journ. of Immunology. Dado á publicidade em dezembro de 1937).

598. 118. 1

ESTUDOS SOBRE LACERTILIOS NEOTROPICOS

4. Lista Remissiva dos Lacertilios do Brasil

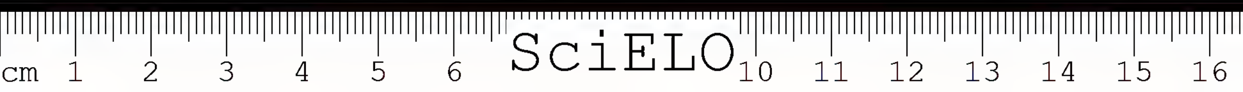
POR

AFRANIO do AMARAL

PROLOGO

No decurso do ultimo septennario, tenho estado a estudar os lagartos encontrados no Brasil, com o intuito especial de comprehender-lhes as relações com os representantes da Ordem, encontradiços nos países vizinhos, em particular, e na região neotropica, em geral. Graças a esse estudo, tenho incidentemente descoberto diversas formas novas, algumas das quaes vieram completar certos hiatos até então existentes na gradativa seriação morphologica dos Lagartos e sobretudo evidentes na familia dos Teiideos.

Desde que, até agora, não se publicou ainda um catalogo systematico e intuitivo sobre essas formas, a não ser o trabalho de Boulenger (Catalogue of the Lizards in the British Museum), o qual, infelizmente, já data para mais de 50 annos, a actual Lista Remissiva representa apenas uma tentativa de systematização das familias, generos, especies e raças de Lacertilios até agora registados no Brasil. Sua publicação visa despertar a critica dos entendidos e a contribuição dos especialistas, para melhor comprehensão da materia.



A — Fam. G E C K O N I D A E

I — Gen. **Briba** Amaral, 1935

in — Mem. Inst. Butantan **9**:253.1935.

Typo: *brasiliana*

1. — Briba brasiliana Amaral, 1935.

Briba brasiliana Amaral, 1935 — *loc. cit.*:253.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Typo e cotypos procedentes do noroeste de Minas Geraes.

II — Gen. **Coleodactylus** Parker, 1926.

in — Ann. & Mag. N. H., 9.**17**:298.1926.

Typo: *meridionalis*

2. — Coleodactylus meridionalis (Boulenger, 1888).

Sphaerodactylus meridionalis Boulenger, 1888 — Ann. & Mag. N. H., 6.**2**:240.
Coleodactylus meridionalis Parker, 1926 — Ann. & Mag. N. H., 9.**17**:298.
Coleodactylus meridionalis Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis **28** (1,2) :1.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Por todo o districto nordestino.

3. — Coleodactylus zernyi Wettstein, 1928.

Coleodactylus zernyi Wettstein, 1928 — Zool. Anz. **76**:110, Fig. 1.
Coleodactylus zernyi Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:1.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Valle amazonico (Pará).

III — Gen. **Gonatodes** FITZINGER, 1843.

in — Syst. Rept.:91.1843.

Typo: *albogularis*

4. — **Gonatodes humeralis** GUICHENOT, 1855.

Gymnodactylus humeralis Guichénot, 1855 — *in* Castelnau, Exp. Amér. Sud. Zool., Rept.: 13.
Gonatodes humeralis Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **1**:62.
Gonatodes humeralis Procter, 1923 — Proc. Zool. Soc. :1064.
Gonatodes humeralis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :3.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Districto equatorial (Pará e Amazonas).

5. — **Gonatodes spinulosus** AMARAL, 1932.

Gonatodes spinulosus Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:56. Figs. 7-8.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Holotypo procedente do rio Juruá, Amazonas.

IV — Gen. **Gymnodactylus** SPIX, 1825.

in — Lacert. Brasil. Spec. Novae: 17.1825.

Typo: *geckoides*

6. — **Gymnodactylus amarali** BARBOUR, 1925.

Gymnodactylus amarali Barbour, 1925 — Proc. Biol. Soc. Wash. **38**:101.
Gymnodactylus amarali Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:3.
Gymnodactylus amarali Amaral, 1932 — *loc. cit.*:58.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Districto nordestino (Piauhy).

7. — **Gymnodactylus conspicuus** AMARAL, 1932.

Gymnodactylus conspicuus Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:57. Figs. 9-10.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Holotypo e paratypos procedentes de Villa Nova, Bahia.

8. — **Gymnodactylus geckoides** Spix, 1825.

Gymnodactylus geckoides Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:17. Tab. **18**: 1.

Gymnodactylus geckoides Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus.**1**:39.

Gymnodactylus geckoides Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:4.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Bahia.

9. — **Gymnodactylus mattogrossensis** Berg, 1895.

Gymnodactylus mattogrossensis Berg, 1895 — Ann. Mus. Buenos Aires **4**:191.

Gymnodactylus mattogrossensis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:4.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Matto Grosso.

V — Gen. **Hemidactylus** Oken, 1817.

in — Isis:1183.1817.

Typo: *mabouia* (= *tubercuicaux*).

10. — **Hemidactylus mabouia** (Jonnès, 1818).

Gecko mabouia Jonnès, 1818 — Bull. Soc. Philom. :138.

Hemidactylus mabouia Gray, 1845 — Cat. Liz. Brit. Mus. :154.

Hemidactylus mabouia Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **1**:122 (*pro parte*).

Hemidactylus mabouia Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :4.

Nome vulgar: Lagartixa ou Briba (corruptela de Vibora).

Distribuição: Por todo o districto oriental (N. E. e S. E.) e centro-oriental.

VI — Gen. **Homonota** Gray, 1845.

in — Cat. Liz. Brit. Mus.:171.1845.

Typo: *darwinii* (= *gaudichaudii*)

11. — **Homonota brachystoma** AMARAL, 1935.

Homonota brachystoma Amaral, 1935 — Mem. Inst. Butantan **9**:254, Fig. 8.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Typo e cotypos de Canna Brava, Goiás.

VII — Gen. **Phyllopezus** PETERS, 1877.

in — Monatsb. Akad. Wiss. Berlin:415.1877.

Typo: *pollicaris* (= *goyazensis*)

12. — **Phyllopezus pollicaris pollicaris** (SPIX, 1825).

Thecadactylus pollicaris Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:17, Tab. **18**:2.

Phyllopezus goyazensis Peters, 1877 — loc. cit.:415.

Hemidactylus mabouia Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:122 (*pro parte*).

Phyllopezus pollicaris Müller & Brongersma, 1933 — Zool. Mededeel. Mus. H. N. Leiden **15**(3,4):156 (*pro parte*).

Phyllopezus pollicaris Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:9 (*pro parte*).

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Bahia e Minas Geraes.

VIII — Gen. **Sphaerodactylus** WAGLER, 1830.

in — Syst. Amph.:143.1830.

Typo: *sputator*

13. — **Sphaerodactylus amazonicus** ANDERSSON, 1918.

Sphaerodactylus amazonicus Andersson, 1918 — Arkiv f. Zool. **11**.(16):1.
Sphaerodactylus amazonicus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :10.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Valle amazonico (Amazonas).

14. — **Sphaerodactylus pfrimeri** M. Ribeiro, 1937.

Sphaerodactylus pfrimeri M. Ribeiro, 1937 — "O Campo" :46-47. 2 Figs. (out. 1937).

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Typo de Goiás.

Nota: Em seu citado trabalho, Miranda Ribeiro, ao enumerar os Gecko-nideos occorrentes no Brasil, omittiu, em relação ao ultimo trabalho de Burt & Burt por elle mencionado, o genero *Hemidactylus*, cuja especie *mabouia* esses auctores assignalam no "Nordeste da America do Sul"; e, igualmente, omittiu as formas por mim registadas *in* "Memorias do Instituto Butantan" vol. 9.1935, a saber: *Briba* Amaral, com a especie typo *brasiliana*; *Gonatodes* Fitzinger, com a especie *spinolosus* por mim descripta em 1932; *Homonota* Gray, com a especie *brachystoma* Amaral.

IX — Gen. **Thecadactylus** Oken, 1817

in — Isis :1183.1817.

Typo: *rapicaudus* (= *laevis*)

15. — **Thecadactylus rapicaudus** (Houttuyn, 1782).

Gekko rapicauda Houttuyn, 1782 — Verhandl. Zeeuwsch. Genoot. Wet. Vlissingen 9:323.

Thecadactylus rapicaudus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :111.

Thecadactylus rapicaudus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :11.

Nome vulgar: Lagartixa.

Distribuição: Districto equatorial (Valle amazonico).

B — Fam. IGUANIDAE

X — Gen. **Anisolepis** Boulenger, 1885.

in — Ann. & Mag. N. H. 5.**16**:85.1885.

Typo: *undulatus* (= *iheringii*)

16. — **Anisolepis grillii** BOULENGER, 1891.

Anisolepis grillii Boulenger, 1891 — Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova 2.**10**:909.
Anisolepis grillii Burt & Burt, 1933 — loc. cit.:11.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Sudeste (Paraná).

17. — **Anisolepis lionotus** WERNER, 1896.

Anisolepis lionotus Werner, 1896 — Verhandl. k. k. zool. — bot. Ges. Wien **46**:470.
Anisolepis lionotus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:12.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Districto meridional (Santa Catharina).

18. — **Anisolepis undulatus** (WIEGMANN, 1834).

Laemanctus undulatus Wiegmann, 1834 — Herp. Mexicana:46.
Enyalius undulatus Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:121.
Anisolepis iheringii Boulenger, 1885 — Ann. & Mag. N. H. 5.**16**:85.
Anisolepis bruchi Koslowsky, 1895 — Rev. La Plata **6**:417.
Anisolepis undulatus Boulenger, 1891 — Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova 2.**10**:909.
Anisolepis undulatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:12.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Extremo sul (Rio Grande do Sul) até o Uruguay e a Argentina.

XI — Gen. **Anolis** DAUDIN, 1802.

in — Hist. Nat. Reptiles **4**:17.1802.

Typo: *carolinensis* (= *bullaris*)

19. — **Anolis bruneti** THOMINOT, 1887.

Anolis bruneti Thominot, 1887 — Bull. Soc. Philom. **7**.11:184.
Anolis bruneti Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:14.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Desconhecida.

20. — **Anolis catenifer** AHL, 1925.

Anolis catenifer Ahl, 1925 — Zool. Anz. **62**:85.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Desconhecida.

21. — **Anolis chrysolepis** DM. & BIBR., 1837.

Anolis chrysolepis Duméril & Bibron, 1837 — Erp. Gén. **4**:94.
Anolis chrysolepis Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:89.
Anolis chrysolepis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit*:14.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Districto tropical (desde Goiás até o Amazonas).

22. — **Anolis garbei** AMARAL, 1932.

Anolis garbei Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan *7*:62, Figs. 17-18.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Holotypo do Pará.

23. — **Anolis holotropis** BOULENGER, 1895.

Anolis holotropis Boulenger, 1895 — Ann. & Mag. N. H. 6.**15**:522.
Anolis holotropis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:16.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Extremo sudoeste (Matto Grosso).

24. — **Anolis lindeni** RUTHVEN, 1912.

Anolis lindeni Ruthven, 1912 — Proc. Biol. Soc. Wash. **25**:163.
Anolis lindeni Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:17.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Valle amazonico (Pará).

25. — **Anolis nasofrontalis** AMARAL, 1932.

Anolis nasofrontalis Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:58, Figs. 11-12.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Holotypo e allotypo do Pará.

26. — **Anolis pseudotigrinus** AMARAL, 1932.

Anolis pseudotigrinus Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:60, Figs. 13-14.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Holotypo do Espirito Santo.

27. — **Anolis transfasciatus** AMARAL, 1932.

Anolis transfasciatus Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:60, Figs. 15-16.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Holotypo do Espirito Santo.

XII — Gen. **Enyalioides** BOULENGER, 1885.

in — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:112.1885.

Typo: *heterolepis*

28. — **Enyalioides laticeps laticeps** (GUICHÉNOT, 1855).

Enyalioides laticeps Guichénot, 1855 — *in* Castelnau — Expéd. Amér. Sud. Zool. Rept.:20, Tab. 5.
Enyalioides laticeps Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:113.
Enyalioides laticeps laticeps Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. **78**. Art. 6:9.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Valle amazonico.

29. — **Enyalioides leechii** BOULENGER, 1885.

Enyalioides leechii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:473.
Enyalioides leechii Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis **28**(1,2):24.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Valle amazonico.

XIII — Gen. **Enyalius** WAGLER, 1830.

in — Syst. Amph. :150.1830.

Typo: *catenatus*



30. — **Enyalius bibronii** Boulenger, 1885.

Enyalius bibronii Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :119.
Enyalius bibronii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :25.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Districto nordestino.

31. — **Enyalius catenatus catenatus** (Wied, 1821).

Agama catenata Wied, 1821 — Reise Brasil. (1815-1817) **2**:247, Abbd.
Enyalius catenatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :118.
Enyalius catenatus catenatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :25.

Nomes vulgares: Anijú-acanga ou Papa-vento.

Distribuição: Districtos oriental e nordestino.

31a. — **Enyalius catenatus paulista** Ihering, 1898.

Enyalius catenatus paulista Ihering, 1898 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila. :102.
Enyalius catenatus paulista Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :25.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Typo de S. Paulo.

32. — **Enyalius fitzingeri** (Wiegmann, 1834).

Laemanctus fitzingeri Wiegmann, 1834 — Herp. Mexicana :46.
Enyalius fitzingeri Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :121.
Enyalius fitzingeri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :25.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Desconhecida.

33. — **Enyalius iheringii** Boulenger, 1885.

Enyalius iheringii Boulenger, 1885 — Ann. & Mag. N. H. 5.**15**:192.
Enyalius iheringii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :25.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Extremo meridional (Rio Grande do Sul).

XIV — Gen. **Garbesaura** Amaral, 1932.

in — Mem. Inst. Butantan **7**:64.1932.

Typo: *garbei*

34 — **Garbesaura garbei** AMARAL, 1932.

Garbesaura garbei Amaral, 1932 — *loc. cit.* :64, Fig. 21.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Holotypo do Pará.

XV — Gen. **Hoplocercus** FITZINGER, 1843.

in — Syst. Reptil. :78.1843.

Typo: *spinosus*

35. — **Hoplocercus spinosus** FITZINGER, 1843.

Hoplocercus spinosus Fitzinger, 1843 — Syst. Reptil. :78.
Hoplocercus spinosus Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:199.
Hoplocercus spinosus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :26.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Sudeste e sudoeste (S. Paulo e Matto Grosso).

XVI — Gen. **Iguana** LAURENTIUS, 1768.

in — Synops. Reptil. :47.1768.

Typo: *iguana* (= *tuberculata*)

36. — **Iguana iguana** (L., 1758).

Lacerta iguana Linneu, 1758 — Syst. Nat. :206.
Iguana tuberculata Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :189.
Iguana iguana Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :26.

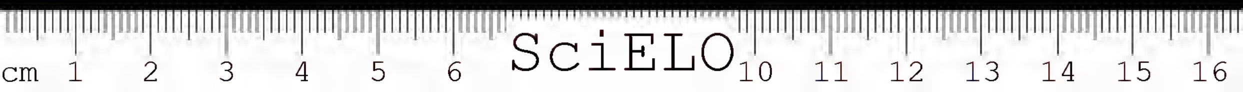
Nomes vulgares: Sinimbú ou Tejubú ou Tijibú.

Distribuição: Districtos equatorial e tropical até perto do parallelo 20° S.

XVII — Gen. **Leiocephalus** GRAY, 1827.

in — Philos. Mag. (London) 2.**2**:207.1827.

Typo: *carinatus*



37. — **Leiocephalus dumerilii** (STEINDACHNER, 1869).

Ophryoessoides dumerilii Steindachner, 1869 — Novara, Reptil. :33 Tab. 2:5.
Liocephalus dumerilii Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :170.
Leiocephalus dumerilii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :27.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico (Pará).

38. — **Leiocephalus tricristatus** (DUMÉRIL, 1851).

Ophryoessoides tricristatus Duméril, 1851 — Cat. Méth. Coll. Reptiles :66.
Liocephalus tricristatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :170.
Leiocephalus tricristatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :29.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Não conhecida.

XVIII — Gen. **Leiosaurus** DM. & BIBR., 1837.

in — Erp. Gén. **4**:241.1837.

Typo: *bellii*

39. — **Leiosaurus paronae** (PERACCA, 1897).

Aperoprisitis paronae Peracca, 1897 — Boll Mus. Zool. Univ. Torino **12**(299):1
Leiosaurus paronae Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :30.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo sul e sudoeste.

XIX — Gen. **Liolaemus** WIEGMANN, 1834.

in — Herp. Mexicana:18.1834.

Typo: *chiliensis*

40. — **Liolaemus glieschi** AHL, 1925.

Liolaemus glieschi Ahl, 1925 — Zool. Anz. **62**:88
Liolaemus glieschi Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :32.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Extremo meridional (Rio Grande do Sul).

41. — **Liolaemus occipitalis** MERTENS, 1928.

Liolaemus occipitalis Mertens, 1928 — Blatt f. Aquar. u. Terrarienk. **15**:302.
Liolaemus occipitalis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :36.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Desconhecida.

42. — **Liolaemus wiegmannii** (DM. & BIBR., 1837).

Proctotretus wiegmannii Duméril & Bibron, 1837 — Erp. Gén. **4**:284.
Liolaemus wiegmannii Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :156
Liolaemus wiegmannii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit* :38.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo meridional (Rio Grande do Sul).

XX — Gen. **Norops** WAGLER, 1830.

in — Syst. Amph. :149.1830.

Typo: *auratus*

43. — **Norops marmorata** AMARAL, 1932.

Norops marmorata Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:62, Figs. 17-18.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Holotypo de Minas Geraes.

44. — **Norops sladeniae** BOULENGER, 1903.

Norops sladeniae Boulenger, 1903 — Proc. Zool. Soc. London **2**:69.
Norops sladeniae Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :38.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Extremo sudoeste (Matto Grosso).

XXI — Gen. **Polychrus** CUVIER, 1817.

in — Règne Animal **2**:40.1817.

Typo: *marmoratus*

45. — **Polychrus marmoratus marmoratus** (L., 1758).

Lacerta marmorata Linneu, 1758 — Syst. Nat. :208.
Polychrus marmoratus Merrem, 1820 — Syst. Amph. :48.
Polychrus marmoratus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :98 (*pro parte*).
Polychrus marmoratus marmoratus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :41.

Nomes vulgares: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Districtos equatorial e nordestino (de Amazonas até Pernambuco).

45a. — **Polychrus marmoratus acutirostris** (Spix, 1825).

Polychrus acutirostris Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae :15. Tab. 14:A.
Polychrus acutirostris Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :99.
Polychrus marmoratus acutirostris Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :41.

Nome vulgar: Camaleão ou Papa-vento.

Distribuição: Districtos oriental, meridional e sul-occidental (desde a Bahia até o Rio Grande do Sul e países vizinhos).

XXII — Gen. **Proctotretus** Dm. & Bibr., 1837.

in — Erp. Gén. **4**:266. 1837.

Typo: *pectinatus*

46. — **Proctotretus azureus** (Müller, 1880).

Tropidocephalus azureus Müller, 1880 — Verhandl. Nat. Ges. Basel **7**:160. Tab.
Saccodeira azurea Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :160.
Proctotretus azureus Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. **78** Art. 6:21.
Proctotretus azureus Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis **28**(1,2) :41.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo meridional.

XXIII — Gen. **Strobilurus** Wiegmann, 1834.

in — Herp. Mexicana :18. 1834.

Typo: *torquatus*

47. — **Strobilurus torquatus** WIEGMANN, 1834.

Strobilurus torquatus Wiegmann, 1834 — Herp. Mexicana :18.
Strobilurus torquatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :181.
Strobilurus torquatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :44.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto nordestino.

XXIV — Gen. **Tapinurus** AMARAL, 1932.

in — Mem. Inst. Butantan **7**:65.1932.

Typo: *scutipunctatus*

48. — **Tapinurus scutipunctatus** AMARAL, 1932.

Tapinurus scutipunctatus Amaral, 1932 — *loc. cit.* :65, Figs. 22-25.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Holotypo e paratypos da Bahia.

XXV — Gen. **Tropidurus** WIED, 1824.

in — Abbd. Naturgesch. Brasil. 1824.

Typo: *torquatus*

49. — **Tropidurus semitaeniatus** (SPIX, 1825).

Agama semitaeniata Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae :13. Tab. *26*:1.
Tropidurus semitaeniatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :178.
Tropidurus semitaeniatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :47.

Nomes vulgares: Papa-vento ou Lagarto.

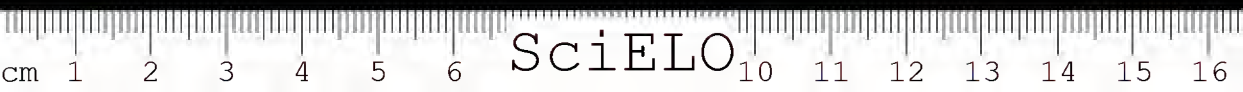
Distribuição: Bahia.

50. — **Tropidurus spinulosus** (COPE, 1862).

Microlophus spinulosus Cope, 1862 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila. :351.
Tropidurus spinulosus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :175.
Tropidurus spinulosus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :47.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo meridional e sul-occidental (Matto Grosso até o Rio Grande do Sul.



51. — **Tropidurus torquatus torquatus** (WIED, 1820).

Stellio torquatus Wied, 1820 — Reise Brasil. (1815-1817) **1**:106.
Tropidurus torquatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :176.
Tropidurus torquatus torquatus Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. 78 Art. 6:27.
Tropidurus torquatus torquatus Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis 28(1,2):48.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo meridional sul-occidental.

51a. — **Tropidurus torquatus hispidus** (SPIX, 1825).

Agama hispida Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae :12. Tab. **15**:2.
Tropidurus hispidus Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :177.
Tropidurus torquatus hispidus Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. 78 Art. 6:26.
Tropidurus torquatus hispidus Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis 28(1,2):48.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto nordestino.

XXVI — Gen. **Urocentron** KAUP, 1827.

in — Isis **19**:612.1827.

Typo: *azureum*

52. — **Urocentron azureum** (L., 1758).

Lacerta azurea Linneu, 1758 — Syst. Nat. :202.
Urocentron azureum Kaup, 1827 — *in* Oken — Isis **19**;612.
Urocentron azureum Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :182.
Urocentron azureum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :48.

Nome vulgar: Lagarto.
Distribuição: Districto equatorial.

XXVII — Gen. **Urostrophus** DM. & BIBR., 1837.

in — Erp. Gen. **4**:77.1837.

Typo: *vauticri*

53. — **Urostrophus vautieri** DM. & BIBR., 1837.

Urostrophus vautieri Duméril & Bibron, 1837 — *loc. cit.* :78. Tab. **37**:1.
Urostrophus vautieri Boulenger, 1885 — *loc. cit.* :123.
Urostrophus vauticri Burt & Burt, 1933 — loc. cit. :49.

Nome vulgar: Papa-vento.

Distribuição: Districtos tropical e sub-tropical.

C — Fam. ANGUIDAE

XXVIII — Gen. **Diploglossus** WIEGMANN, 1834.

in — Herp. Mexicana :36.1834.

Typo: *fasciatus*

54. — **Diploglossus fasciatus** WIEGMANN, 1834.

Diploglossus fasciatus Wiegmann, 1834 — Herp. Mexicana :36.
Diploglossus fasciatus Boulenger, 1855 — *loc. cit.*:287.

Nome vulgar: Lagarto, Briba ou Bivora (Vibora).

Distribuição: Districtos oriental e nordestino.

55. — **Diploglossus lessonae** PERACCA, 1890.

Diploglossus lessonae Peracca, 1890 — Boll. Mus. Zool. Univ. Torino **5**(77): 1-5.
Diploglossus lessonae Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:50.

Nome vulgar: Lagarto.

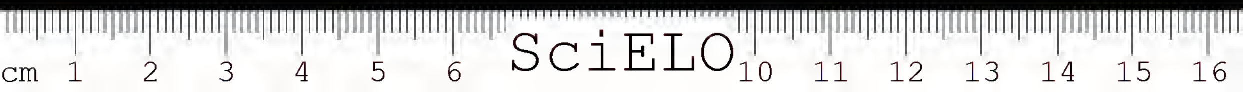
Distribuição: Desconhecida.

56. — **Diploglossus tenuifasciatus** PARKER, 1924.

Diploglossus tenuifasciatus Parker, 1924 — Ann. & Mag. N. H. 9.**13**:586.
Diploglossus tenuifasciatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:50.

Nome vulgar: Lagarto ou Briba.

Distribuição: Extremo do districto nordestino.



XXIX — Gen. **Ophiodes** WAGLER, 1828.

in — Isis :740.1828.

Typo: *striatus*

57. — **Ophiodes striatus grilli** (BOULENGER, 1913).

Ophiodes grilli Boulenger, 1913 — Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova 3.6:49.
Ophiodes grilli Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:50.

Nomes vulgares: Cobra-vidro ou Quebra-quebra.

Distribuição: Districto sul-oriental (Paraná).

57a. — **Ophiodes striatus striatus** (SPIX, 1825).

Pygopus striatus Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:25. Tab. **28**.1.
Ophiodes striatus Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:296.
Ophiodes striatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:51.

Nomes vulgares: Cobra-vidro ou Quebra-quebra.

Distribuição: Por todo o territorio, do lado oriental.

57b. — **Ophiodes striatus vertebralis** (BOCOURT, 1881).

Ophiodes vertebralis Bocourt, 1881 — Miss. Sc. Mex. Amer. Cent.:459. Tab. **22** G:3.
Ophiodes vertebralis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:297.
Ophiodes vertebralis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:51.

Nome vulgar: Cobra-vidro.

Distribuição: Extremo meridional (Rio Grande do Sul).

D — Fam. TEIIDAE

XXX — Gen. **Ameiva** MEYER, 1795.

in — Synops. Reptil.:27.1795.

Typo: *ameiva* (= *americana*)

58. — **Ameiva ameiva ameiva** (L., 1758).

Lacerta ameiva Linneu, 1758 — Syst. Nat.:202.
Ameiva surinamensis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:352 (*pro parte*).
Ameiva ameiva ameiva Barbour & Noble, 1915 — Bull. Mus. Comp. Zool. **59**:462.
Ameiva ameiva ameiva Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:51.

Nomes vulgares: Jacaré-pinima ou Bico-doce.

Distribuição: Desde o valle amazonico até os districtos oriental, centro-oriental e occidental.

58a. — **Ameiva ameiva laeta** (COPE, 1862).

Ameiva laeta Cope, 1862 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila.:65.
Ameiva surinamensis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:352 (*pro parte*).
Ameiva ameiva laeta Barbour & Noble, 1915 — *loc cit.*:467.
Ameiva ameiva laeta Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:51.

Nome vulgar: Teiú.

Distribuição: Districto sul-oriental.

XXXI — Gen. **Anotosaura** AMARAL, 1932.

in — Mem. Inst. Butantan **7**:68.1932.

Typo: *collaris*

59. — **Anotosaura collaris** AMARAL, 1932.

Anotosaura collaris Amaral, 1932 — *loc. cit.*:69, Figs. 36-40.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Holotypo da Bahia.

XXXII — Gen. **Apatelus** AMARAL, 1935.

in — Mem. Inst. Butantan **9**:249.1935.

Typo: *bresslaui*

60. — **Apatelus bresslaui** AMARAL, 1935.

Apatelus bresslaui Amaral, 1935 — *loc. cit.*:350, Figs. 4-7.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Holotypo de S. Paulo.

XXXIII — Gen. **Arthrosaura** BOULENGER, 1885.

in — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:389.1885.

Typo: *reticulata*

61. — **Arthrosaura concolor** (TSCHUDI, 1847).

Pantodactylus concolor Tschudi, 1847 — Arkiv f. Naturg. **30**:48,50.
Arthrosaura concolor Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:55.

Nomes vulgares: Lagarto ou Calango.

Distribuição: Districto equatorial (Extremo septentrional).

62. — **Arthrosaura kocki** (de JEUDE, 1904).

Prionodactylus kocki de Jeude, 1904 — Notes Leyden Mus. **25**:91.
Arthrosaura kocki Brongersma, 1928 — Zool. Anz. **78**:333.
Arthrosaura kockii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:55.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Extremo septentrional (Pará).

XXXIV — Gen. **Arthroseps** BOULENGER, 1898.

in — Proc. Zool. Soc. London.:920.1898.

Typo: *werneri*

63. — **Arthroseps fluminensis** AMARAL, 1932.

Arthroseps fluminensis Amaral, 1932 — *loc. cit.*:66, Figs. 26-30.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Holotypo do Rio de Janeiro.

64. — **Arthroseps werneri** BOULENGER, 1898.

Arthroseps werneri Boulenger, 1898 — Proc. Zool. Soc. London.:921.
Arthroseps werneri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :56.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Districto meridional.



XXXV — Gen. **Calliscincopus** Ruthven, 1916.

in — Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich. **22**:2.1916.

Typo: *agilis*

65. — **Calliscincopus agilis** Ruthven, 1916.

Calliscincopus agilis Ruthven, 1916 — *loc. cit.*:2.
Tretioscincus romani Andersson, 1918 — Arkiv f. Zool. **11**(16):5, Figs. 3-4.
Tretioscincus brasiliensis Müller, 1923 — Zool. Anz. **57**:49.
Calliscincopus agilis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :58.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Valle amazonico.

XXXVI — **Cnemidophorus** Wagler, 1830

in — Syst. Amph.:154.1830.

Typo: *murinus*

66. — **Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus** (L., 1758).

Lacerta lemniscata Linneu, 1758 — Syst. Nat.:209.
Cnemidophorus lemniscatus Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:363.
Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus Beebe, 1919 — Zoologica **2**:212.
Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:59.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Valle Amazonico.

67. — **Cnemidophorus ocellifer** (Spix, 1825).

Tejus ocellifer Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novac:23. Tab. **25**.
Cnemidophorus ocellifer Peters, 1877 — Monatsb. Akad. Wiss. Berlin:414.
Cnemidophorus ocellifer Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:372.
Cnemidophorus ocellifer Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:59.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Districtos tropical e sub-tropical, desde o Nordeste (Pernambuco), pelo centro, até o Sudoeste (Matto Grosso).

XXXVII — Gen. **Colobodactylus** Amaral, 1932.

in — Mem. Inst. Butantan **7**:70.1932.

Typo: *taunayi*

68. — **Colobodactylus taunayi** Amaral, 1932.

Colobodactylus taunayi Amaral, 1932 — *loc. cit.*:70, Figs. 41-45.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Holotypo e paratypos de S. Paulo.

XXXVIII — Gen. **Colobosaura** Boulenger, 1887

in — Cat. Liz. Brit. Mus. **3**:508.1887.

Typo: *modesta*

69. — **Colobosaura mentalis** Amaral, 1932.

Colobosaura mentalis Amaral, 1932 — *loc. cit.*:72. Figs. 46-50.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Holotypo e allotypo da Bahia.

70. — **Colobosaura modesta** (Reinh. & Lütk., 1861).

Perodactylus modestus Reinhardt & Lütken, 1861 — Vidensk. Meddel. Nat. Foren. Kjobenh.:280. Tab. **5**:7.

Perodactylus modestus Boulenger, 1887 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:423.1885 & **3**:508 (*Colobosaura modesta*).

Colobosaura modesta Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:60.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Typo do Morro da Garça.

XXXIX — Gen. **Dracaena** Daudin, 1802.

in — Hist. Nat. Reptiles **2**:421.1802.

Typo: *guianensis*

71. — **Dracaena guianensis** DAUDIN, 1802.

Dracaena guianensis Daudin, 1802 — Hist. Nat. Reptiles **2**:423 Tab. **28**.
Dracaena guianensis Boulenger, 1885 — *loc. cit.* **2**:338.
Dracaena guianensis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:61.

Nome vulgar: Calango.

Distribuição: Desde o valle amazonico até o districto nordestino.

XL — Gen. **Ecpleopus** DM. & BIBR., 1839.

in — Erp. Gen. **5**:434.1839.

Typo: *gaudichaudii*

72. — **Ecpleopus gaudichaudii** DM. & BIBR., 1839.

Ecpleopus gaudichaudii Duméril & Bibron, 1839 — *loc. cit.*:436.
Ecpleopus gaudichaudii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:401.
Ecpleopus gaudichaudii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:61.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Desconhecida.

XLI — Gen. **Elaphrosaura** AMARAL, 1932.

in — Mem. Inst. Butantan **7**:67.1932.

Typo: *spitzi*

73. — **Elaphrosaura spitzi** AMARAL, 1932.

Elaphrosaura spitzi Amaral, 1932 — *loc. cit.*:68, Figs. 31-35.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Holotypo da serra de Cubatão, S. Paulo.

XLII — Gen. **Euspondylus** TSCHUDI, 1845.

in — Fauna Peruana, Herpet.:41.1845.

Typo: *maculatus*

74. — **Euspondylus champsonatus** (Werner, 1910).

Prionodactylus champsonatus Werner, 1910 — Mitt. Naturh. Mus. Hamburg **27**(2) :31.
Euspondylus champsonatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:62.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto meridional.

75. — **Euspondylus cupreus** Andersson, 1916.

Euspondylus cupreus Andersson, 1916 — Göteborgs Kungl. Vetensk. Vitterhets-samhalles Handl. 4.**17**(5) :6.
Euspondylus cupreus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:62.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Desconhecida.

76. — **Euspondylus quadrilineatus** (Boettger, 1876).

Cercosaura (*Pantodactylus*) *quadrilineatus* Boettger, 1876 — Ber. Senckenb. Ges.:141. Tab..
Prionodactylus quadrilineatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:393.
Prionodactylus quadrilineatus Griffin, 1917 — Ann. Carnegie Mus **11**:428.
Prionodactylus albostrigatus Griffin, 1917 — *loc. cit.*:314.
Euspondylus quadrilineatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:64.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto centro-meridional.

XLIII — Gen. **Gymnophthalmus** Merrem, 1820.

in — Syst. Amph.:74.1820.

Typo: *lineatus* (= *quadrilineatus*)

77. — **Gymnophthalmus lineatus** (L., 1758).

Lacerta lineata Linneu, 1758 — Syst. Nat.:209.
Lacerta quadrilineata Linneu, 1766 — Syst. Nat. **1**:371.
Gymnophthalmus quadrilineatus Merrem, 1820 — Tent. Syst. Amph.:74.
Gymnophthalmus quadrilineatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:427.
Gymnophthalmus lineatus Andersson, 1900 — Bihang Svenska Vet. — Akad. Handl. **26** Sect. 4(1) :16.
Gymnophthalmus lineatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:65.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto equatorial.

78. — **Gymnophthalmus multiscutatus** Amaral, 1932.

Gymnophthalmus multiscutatus Amaral, 1932. — *loc. cit.*:73, Figs. 51-55.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Holotypo do sertão da Bahia.

XLIV — Gen. **Heterodactylus** Spix, 1825.

in — Lacert. Brasil. Spec. Novae.:25.1825.

Typo: *imbricatus*

79. — **Heterodactylus imbricatus** Spix, 1825.

Heterodactylus imbricatus Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:25 Tab. **27**:1.
Heterodactylus imbricatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:422.
Heterodactylus imbricatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:66.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto centro-meridional e oriental.

80. — **Heterodactylus lundii** Reinh. & Lütk., 1861.

Heterodactylus lundii Reinhardt & Lütken, 1861 — Vidensk. Meddel. Nat. Foren Kjöbenh:214. Tab. **6**:10.
Heterodactylus lundii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:423.
Heterodactylus lundii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:66.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Typo da serra de Piedade.

XLV — Gen. **Iphisa** Gray, 1851.

in — Proc. Zool. Soc. London:39.1851.

Typo: *elegans*

81. — **Iphisa elegans** Gray, 1851.

Iphisa elegans Gray, 1851 — *loc. cit.*:39.
Iphisa elegans Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:424.
Iphisa elegans Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:66.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico (Pará).

XLVI — Gen. **Kentropyx** SPIX, 1825.

in — Lacert. Brasil. Spec. Novae:21.1825.

Typo: *calcaratus*

82. — **Kentropyx calcaratus** SPIX, 1825

Kentropyx calcaratus Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:21. Tab. 22:2.
Monoplocus dorsalis Günther, 1859 — Proc. Zool. Soc. London:404.
Centropyx pelviceps Cope, 1868 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila.:98.
Centropyx calcaratus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:341.
Kentropyx calcaratus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:66.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districtos equatorial e tropical.

83. — **Kentropyx paulensis** BOETTGER, 1892.

Kentropyx paulensis Boettger, 1892 — Kat. Reptil. Samml. Mus. Senckenb. Naturf. Ges. **1**:73.
Kentropyx paulensis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :67.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto centro-meridional.

84. — **Kentropyx williamsoni** RUTHVEN, 1929

Kentropyx williamsoni Ruthven, 1929 — Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich. (206):1.
Kentropyx williamsoni Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:67.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico.

XLVII — Gen. **Leposoma** SPIX, 1825.

in — Lacert. Brasil. Spec. Novae:24.1825.

Typo: *scincoides*

88. — **Neusticurus bicarinatus** (L., 1758).

Lacerta bicarinata Linneu, 1758 — Syst. Nat.:201.
Neusticurus bicarinatus Duméril & Bibron, 1839 — *loc. cit.*:64.
Neusticurus bicarinatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:381.
Neusticurus bicarinatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:69.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto tropical.

L — Gen. **Pantodactylus** DM. & BIBR., 1839.

in — Erp. Gén. **5**:428.1839.

Typo: *schreibersii* (= *dorbignyi*)

89. — **Pantodactylus amazonius** (RUTHVEN, 1924)

Alopoglossus amazonius Ruthven, 1924 — Occ. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich. (153):1.
Pantodactylus amazonius Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:70.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto occidental e tropical (Matto Grosso).

90. — **Pantodactylus gracilis** (WERNER, 1913).

Alopoglossus gracilis Werner, 1913 — Mitt. Naturh. Mus. Hamburg. **30**,2:13.
Pantodactylus gracilis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :71.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto sul-oriental (Santa Catharina).

91. — **Pantodactylus schreibersii** (WIEGMANN, 1834).

Cercosaura schreibersii Wiegmann, 1834 — Herpert. Mexicana:10.
Pantodactylus schreibersii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:388.
Pantodactylus schreibersii Burt & Burt, 1933 — *loc cit.*:71.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Extremo meridional.



85. — **Leposoma percarinatum** (Müller, 1923).

Hylosaurus percarinatus Müller, 1923 — Zool. Anz. **57**:146.
Leposoma tæniata Noble, 1923 — Zoologica **3**(15):303.
Hylosaurus muelleri Mertens, 1925 — Senckenbergiana **7**:76.
Leposoma percarinatum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:68.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico (Pará).

86. — **Leposoma scincoides** Spix, 1825.

Leposoma scincoides Spix. 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:24. Tab. **27**:2.
Leposoma scincoides Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:386.
Leposoma scincoides Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:68.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico.

XLVIII — Gen. **Micrablepharus** Boettger, 1885.

in — Zschr. f. Naturw. **58**:217.1885.

Typo: *maximiliani* (= *glaucurus*)

87. — **Micrablepharus maximiliani** (Reinh. & Lütk., 1861).

Gymnophthalmus maximiliani Reinhardt & Lütken, 1861 — *loc. cit.*:211. Tab. **5**:6.
Micrablepharus maximiliani Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:426.
Micrablepharus maximiliani Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:68.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto sul-occidental.

XLIX — Gen. **Neusticurus** Dm. & Bibr., 1839.

in — Erp. Gén. **5**:61.1839.

Typo: *bicarinatus*

LI — Gen. **Placosoma** TSCHUDI, 1847

in — Arch. f. Naturg. **13**,1:50.1847.

Typo: *cordylinum*

92. — **Placosoma cordylinum** TSCHUDI, 1847.

Placosoma cordylinum Tschudi, 1847 — *loc. cit.*:51.
Placosoma cordylinum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:397.
Placosoma cordylinum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:72.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto tropical até Rio de Janeiro.

LII — Gen. **Stenolepis** BOULENGER, 1887.

in — Proc. Zool. Soc. London:640.1887.

Typo: *ridleyi*

93. — **Stenolepis ridleyi** BOULENGER, 1887.

Stenolepis ridleyi Boulenger, 1887 — *loc. cit.*:640.
Stenolepis ridleyi Burt & Burt, 1933 — *loc cit.*:76.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Nordeste (Pernambuco).

LIII — Gen. **Teius** MERREM, 1820.

in — Syst. Amph.:60.1820.

Typo: *teyou* (= *viridis*).

94. — **Teius teyou teyou** (DAUDIN, 1802).

Lacerta teyou Daudin, 1802 — Hist. Nat. Reptiles **3**:195.
Teius teyou Boulenger, 1885 — Cat. Liz. Brit. Mus. **2**:379.
Teius teyou teyou Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. **78**, Art. 6:37.
Teius teyou teyou Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis **28**(1,2):76.

Nomes vulgares: Lagarto ou Teiú.

Distribuição: Districto centro-meridional.

LIV — Gen. **Tupinambis** DAUDIN, 1802.

in — Hist. Nat. Reptiles **3**:6.1802.

Typo: *teguixin* (= *monitor*).

95. — **Tupinambis duséni** LÖNNBERG, 1910.

Tupinambis duséni Lönnberg, 1910 — Arkiv f. Zool. 6(9):1.
Tupinambis duséni Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :77.

Nomes vulgares: Lagarto ou Teiú.

Distribuição: Districto meridional (Paraná).

96. — **Tupinambis nigropunctatus** SPIX, 1825.

Tupinambis nigropunctatus Spix, 1825 — Lacert. Brasil. Spec. Novae:18. Tab. **20**.
Tupinambis nigropunctatus Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:337.
Tupinambis nigropunctatus Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:77.

Nomes vulgares: Lagarto ou Tejú-assú.

Distribuição: Districto equatorial (Valle amazonico).

97. — **Tupinambis teguixin** (L., 1758).

Lacerta teguixin Linneu, 1758 — Syst. Nat.:208.
Tupinambis teguixin Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:335.
Tupinambis teguixin Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:77.

Nomes vulgares: Tejú-assú ou Teiú.

Distribuição: Por grande parte do territorio.

E — Fam. AMPHISBAENIDAE

LV — Gen. **Amphisbaena** L., 1758.

in — Syst. Nat. :209.1758.

Typo: *fuliginosa*

Nota: Genero carente de meticulosa revisão, que provavelmente lhe reduzirá as especies, agrupaveis talvez em subgeneros e representadas por individuos portadores de enormes variações morphologicas.

98. — **Amphisbaena albissima** AMARAL, 1932.

Amphisbaena albissima Amaral, 1932, — *loc. cit.*:55, Figs. 4-6.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Holotypo de S. Paulo.

99. — **Amphisbaena brachyura** AMARAL, 1932.

Amphisbaena brachyura Amaral, 1932 — *loc. cit.*:55, Figs. 1-3.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Holotypo de Alagoas.

100. — **Amphisbaena fuliginosa** (L., 1758).

Amphisbaena fuliginosa Linneu, 1758 — Syst Nat.: 229.
Amphisbaena fuliginosa Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:437.
Amphisbaena mattogrossensis Peracca, 1898 — Bol. Mus. Zool. Univ. Torino. **13**(326):1.
Amphisbaena fuliginosa Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:79.
Amphisbaena mattogrossensis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena fuliginosa fuliginosa Amaral, 1935 — Mem. Inst. Butantan **9**:231

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Raça commum e representativa do districto norte-occidental.

100a. — **Amphisbaena fuliginosa alba** (L., 1758).

Amphisbaena alba Linneu, 1758 — *loc. cit.*:229.
Amphisbaena alba Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:438.
Amphisbaena alba Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:78.
Amphisbaena fuliginosa alba Amaral, 1935 — *loc. cit.*:231.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Raça commum e representativa do districto sul-oriental.

101. — **Amphisbaena petrei** DM. & BIBR., 1839.

Amphisbaena petrei Duméril & Bibron, 1839 — Erp. Gén. **5**:486.
Amphisbaena leucocephala Peters, 1878 — Monatsb. Akad. Wiss. Berlin:778, Fig. 1.

Amphisbaena subocularis Peters, 1878 — *loc. cit.*:779, Fig. 2.
Amphisbaena mertensii Strauch, 1881 — Méd. Biol. Acad. S. Petersburgo **11**:385.
Amphisbaena beniensis Cope, 1885 — Proc. Amer. Philos. Soc. **22**:184,188, Fig. 2.
Amphisbaena beniensis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:439.
Amphisbaena leucocephala Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:441.
Amphisbaena mertensii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:441.
Amphisbaena petrii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:440.
Amphisbaena subocularis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:440.
Amphisbaena beniensis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:78.
Amphisbaena leucocephala Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena mertensii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena petrii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:81.
Amphisbaena subocularis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:82.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Districto tropical, desde o nordeste, através do centro, até o sudoeste e países vizinhos.

102. — **Amphisbaena ridleyi** Boulenger, 1889.

Amphisbaena ridleyi Boulenger, 1889 — J. Linn. Soc. London **20**:481.
Amphisbaena ridleyi Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:81.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Typo da Ilha Fernando de Noronha.

103. — **Amphisbaena silvestrii** Boulenger, 1902.

Amphisbaena silvestrii Boulenger, 1902 — Ann. & Mag. N. H. 7. **9**:287.
Amphisbaena silvestri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :81.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Typo de Matto Grosso.

104. — **Amphisbaena vermicularis vermicularis** (Spix, 1824).

Amphisbaena vermicularis Spix, 1824 — Serp. Brasil Spec. Novae:73. Tab. 25:2.
Amphisbaena brasiliana Gray, 1865 — Proc. Zool. Soc. London:448.
Amphisbaena steindachneri Strauch, 1881 — *loc. cit.*:407.
Amphisbaena vermicularis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:441.

Amphisbaena mitchelli Procter, 1923 — Proc. Zool. Soc. London:1065.
Amphisbaena brasiliana Burt & Burt,, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena mitchelli Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:81.
Amphisbaena steindachneri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:81.
Amphisbaena vermicularis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:82.
Amphisbaena vermicularis vermicularis Amaral, 1932 — Mem. Inst. Butantan **7**:54 & **9**:225.1935.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Forma septentrional, commum nos districtos equatorial e tropical.

104a. — **Amphisbaena vermicularis centralis** AMARAL, 1935.

Amphisbaena vermicularis centralis Amaral, 1935 — *loc. cit.* **9**:255, **Fig. 9.**

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

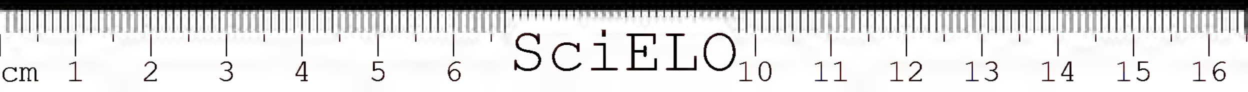
Distribuição: Forma central, procedente do districto tropical (Goiás e Minas Geraes).

104b. — **Amphisbaena vermicularis darwinii** (DM. & BIBR., 1839).

Amphisbaena darwinii Duméril & Burt, Bibron, 1839 — Erp. Gén. **5**:490.
Amphisbaena angustifrons Cope, 1861 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila. :70.
Amphisbaena mildei Peters, 1878 — Monatsb. Akad. Wiss Berlin:779, Fig **3.**
Amphisbaena gracilis Strauch, 1881 — *loc. cit.* :391.
Amphisbaena albocingulata Boettger, 1885 — Zschr. f. Naturw. **58**:215.
Amphisbaena albocingulata Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:443.
Amphisbaena darwinii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:442.
Amphisbaena gracilis Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:444.
Amphisbaena mildei Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:445.
Amphisbaena dubia Müller, 1924 — Mitt. Zool. Mus. Berlin **11**:86.
Amphisbaena albocingulata Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:78.
Amphisbaena darwinii Burt & Burt, 1933 — *loc cit.*:79.
Amphisbaena dubia Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:79.
Amphisbaena gracilis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena mildei Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:80.
Amphisbaena vermicularis darwinii Amaral, 1932 — *loc cit.* **7**:54. & **9**:255.1935.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Forma meridional, commum no districto subtropical, desde S. Paulo, Matto Grosso até o Rio Grande do Sul e países vizinhos.



LVI — Gen. **Anopsibaena** STEJNEGER, 1916.

in — Proc. Biol. Soc. Wash. 29:96.1916.

Typo: *kingii*

Nota: Segundo mostrou Stejneger, o primitivo nome *Anops*, usado por Bell, Boulenger e outros, estava preoccupado por um Crustaceo, *in* Oken, 1815.

105. — **Anopsibaena kingii** (BELL, 1883).

Anops kingii Bell, 1883 — Proc. Zool. Soc. London.:99.
Anops kingii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:451.
Anopsibaena kingii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:82.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Districto meridional.

LVII — Gen. **Aulura** BARBOUR, 1914.

in — Proc. N. Eng. Zool. Club 4:96.1914.

Typo: *anomala*

106. — **Aulura anomala** BARBOUR, 1914.

Aulura anomala Barbour, 1914 — *loc. cit.*:96.
Aulura anomala Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:82.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Desconhecida.

LVIII — Gen. **Leposternon** SPIX, 1824.

in — Serp. Brasil. Spec. Novae:70.1824.

Typo: *microcephalum*

Nota: Genero carente de revisão meticulosa, que provavelmente lhe reduzirá o numero de especies, todas muito affins e representadas por individuos portadores de enormes variações morphologicas.

107. — **Leposternon crassum** (STRAUCH, 1881).

Lepidosternon crassum Strauch, 1881 — *loc. cit.*:433.
Lepidosternon crassum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:465.
Leposternon crassum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:83.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Districto tropical.

108. — **Leposternon guentheri** (STRAUCH, 1881).

Lepidosternon guentheri Strauch, 1881 — *loc. cit.*:449.
Lepidosternon guentheri Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:466.
Leposternon guentheri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:83.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Até ha pouco desconhecida. O Instituto Butantan possue exemplares procedentes de S. Paulo e de Matto Grosso.

109. — **Leposternon infraorbitale** (BERTHOLD, 1859).

Lepidosternon infraorbitale Berthold, 1859 — Göttingen Nachr.:179.
Lepidosternon infraorbitale Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:463.
Leposternon infraorbitale Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:83.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Nordeste (Bahia).

110. — **Leposternon microcephalum** SPIX, 1824.

Leposternon microcephalus Spix, 1824 — Serp. Brasil. Spec. Novae:70. Tab. *26*:2.
Lepidosternon microcephalum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:462.
Leposternon microcephalum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:84.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Commum no Rio de Janeiro.

111. — **Leposternon octostegum** (DUMÉRIL, 1851).

Lepidosternon octostegum Duméril, 1851 — Cat. Méth. Coll. Reptiles:150.
Lepidosternon octostegum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:468.
Leposternon octostegum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:84.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Desconhecida.

112. — **Leposternon petersii** (Strauch, 1881).

Lepidosternon petersii Strauch, 1881 — *loc. cit.*:438.
Lepidosternon petersii Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:464.
Leposternon petersii Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:84.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Desconhecida.

113. — **Leposternon polystegum** (Duméril, 1851).

Lepidosternon polystegum Duméril, 1851 — *loc. cit.*:149.
Lepidosternon polystegum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:464.
Leposternon polystegum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:84.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Nordeste (Bahia).

114. — **Leposternon rostratum** (Strauch, 1881).

Lepidosternon rostratum Strauch, 1881 — *loc. cit.*:433.
Lepidosternon rostratum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:464.
Leposternon rotratum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:84.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Nordeste (Bahia).

115. — **Leposternon scutigerum** (Hemprich, 1820).

Amphisbaena scutigera Hemprich, 1820 — Verhandl. Ges. Naturf. Freunde Berlin **1**:129.

Lepidosternon scutigerum Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:469.

Leposternon scutigerum Burt & Burt, 1930 — Proc. U. S. Nat. Mus. 87 Art. 6:41.

Leposternon scutigerum Burt & Burt, 1933 — Transact. Acad. Sc. St. Louis **28**(1,2):85.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Districto centro-oriental (Rio de Janeiro).

116. — **Leposternon wuchereri** (PETERS, 1879).

Lepidosternon wuchereri Peters, 1879 — Monatsb. Akad. Wiss. Berlin:276. Fig. 2.

Lepidosternon wuchereri Boulenger, 1885 — *loc. cit.*:466.

Lepidosternon sinuosum Peracca, 1895 — Boll. Mus. Zool. Univ. Torino **10**(200):1.

Leposternon sinuosum Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:85.

Leposternon wuchereri Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:85.

Nome vulgar: Cobra de duas cabeças.

Distribuição: Desconhecida.

D — Fam. SCINCIDAE

LIX — Gen. **Mabuya** FITZINGER, 1826.

in — Neue Classif. Reptil.:23.1826.

Typo: *carinata*

117 — **Mabuya mabouya mabouya** (LACÉPÈDE, 1788).

Lacerta mabouya Lacépède, 1788 — Hist. Nat. Quadr. Ovip. **2**:378, Tab. **24**, (*pro parte*).

Mabuia agilis Boulenger, 1887 — *loc. cit.* **3**:190.

Mabuya agilis Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:86.

Mabuya agilis agilis Amaral, 1935 — *loc. cit.* **9**:246.

Mabuya mabouya mabouya Dunn, 1935 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila. **87**:544.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto equatorial e tropical, desde o valle amazonico até S. Paulo e Matto Grosso.

117a. — **Mabuya mabouya dorsivittata** (COPE, 1862).

Mabuia dorsivittata Cope, 1862 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila. **9**:350.

Mabuia dorsivittata Boulenger, 1887 — *loc. cit.* :192.

Mabuya dorsovittata Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.* :86.

Mabuya agilis dorsivittata Amaral, 1935 — *loc. cit.* **9**:247.

Mabuya dorsovittata Dunn, 1935 — *loc. cit.*:547.

Nota: *Burt* e *Dunn*, em seus trabalhos, grapharam *dorsovittata*, o que é incorrecto, pois *Cope* escreveu *dorsivittata*.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto sub-tropical, de S. Paulo para o sul e sudoeste e países vizinhos.

118 — **Mabuya frenata frenata** (Cope, 1862).

Emoca frenata Cope, 1862 — Proc. Acad. Nat. Sc. Phila **5**:187.
Mabuia frenata Boulenger, 1887 — *loc. cit.*:194.
Mabuya frenata Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:86.
Mabuya frenata frenata Dunn, 1935 — *loc. cit.*:551.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Districto sub-tropical, de S. Paulo para o sudoeste e países vizinhos.

119 — **Mabuya guaporicola** Dunn, 1935.

Mabuya guaporicola Dunn, 1935 — *loc. cit.*:549.

Nome vulgar: Desconhecido.

Distribuição: Typo de Guaporé, Matto Grosso occidental.

120 — **Mabuya nigropalmata** Andersson, 1918.

Mabuia nigropalmata Andersson, 1918 — Arkiv f. Zool. **11**(16):8.
Mabuya nigropalmata Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:86.
Mabuya nigropalmata Dunn. 1935 — *loc. cit.*:554.

Nome vulgar: Lagarto.

Distribuição: Valle amazonico (Amazonas).

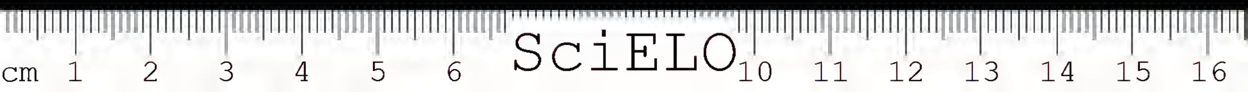
121 — **Mabuya punctata** (Gray, 1838).

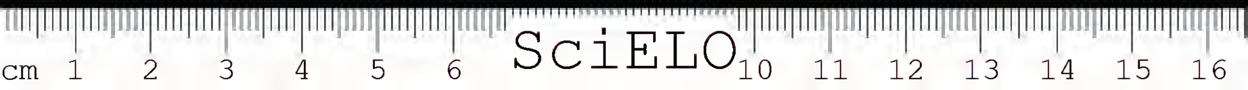
Tiliqua punctata Gray, 1838 — Ann. & Mag. N. H. **2**:289.
Mabuia punctata Boulenger, 1887 — *loc. cit.*:160. Tab. **9**:1.
Mabuya punctata Burt & Burt, 1933 — *loc. cit.*:86.
Mabuya punctata Dunn, 1935 — *loc. cit.*:535.

Nome vulgar: Lagarto.

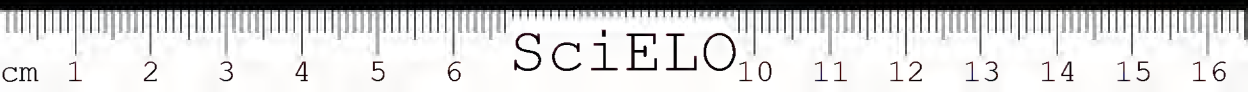
Distribuição: Ilha Fernando de Noronha.

INDICE SYSTEMATICO

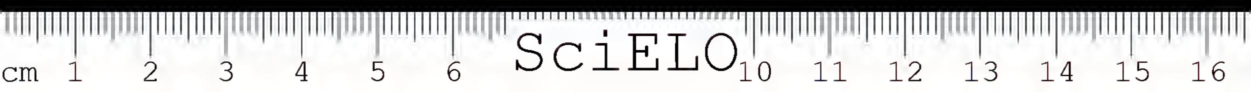




INDICE ALPHABETICO



(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

598.1281

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DOS OPHIDIOS DO BRASIL

9. Nova especie de Colubrideo opisthoglypho confundivel com *Philodryas serra* (SCHLEGEL, 1837)

POR

AFRANIO do AMARAL

INTRODUCÇÃO

Em trabalho anterior (1), conservei a especie *Philodryas serra* com o conceito em que ella appareceu no trabalho de Boulenger (2). Todavia, já naquella occasião, eu estava convencido de que o nome *Philodryas serra* representava realmente um composto. Isto, porque em verificações, que vinha fazendo desde 1935, havia notado que os exemplares até então classificados como *P. serra* se podiam distinguir em dois grupos, um dos quaes se caracterizava pela presença de escamas dorsaes carinadas e o outro, pela ausencia de escamas desse typo.

Sem duvida, a confusão desses dois grupos de exemplares sob uma só designação especifica data de quasi um seculo, conforme se verá pela seguinte

RESENHA BIBLIOGRAPHICA

1. Schlegel, em 1837 (3), descreveu e figurou sob o nome de *Herpetodryas serra* uma serpente dotada de escamas carinadas no dorso e na nuca e com a seguinte pholidose: escamas dorsaes 21; placas ventraes 238-244; placas subcaudaes 106 pares. Pelo proprio nome especifico se verifica que Schlegel se havia impressionado com o caracter aspero (*serra*=aspero) das escamas

dorsaes. Nestas condições, deverão classificar-se como *Philodryas serra* todos os exemplares portadores de escamas dorsaes asperas e de um numero de placas ventraes approximado daquelle que Schlegel assignalou.

2. Fitzinger, em 1843 (4), ligou a especie *serra* ao genero *Tropidodipsas*, attribuindo-a a Schlegel (3), seu descobridor. Registou, portanto, uma especie absolutamente identica á deste herpetologo.

3. Duméril & Bibron, em 1854 (5), no entanto, ao darem a descripção de *Dryophylax serra*, atrribuiram a essa especie a posse de escamas dorsaes, ora carinadas, ora lisas, dizendo, textualmente: "Cette espèce nous offre une particularité tout-à-fait exceptionelle, en ce que, chez certains individus, les écailles du tronc sont parfaitemente planes, tandiz que chez d'autres, ni plus jeunes ni moins âgés, elles ont une forte carène, qui, du reste, n'est point une saillie du derme, mais seulement de l'epiderme, car elle manque dans les points où cette surpeau a été détruite".

Felizmente, pela analyse da formula por elles registada para a pholidose de sua especie *serra*, verifiquei que Duméril e Bibron haviam realmente confundido duas formas differentes de ophidios sob tal nome especifico. Assim é que assignalaram para a sua especie *serra*: a) presença de 178 a 228 placas ventraes; b) escamas dorsaes, ora carinadas, ora lisas.

4. Günther, em 1858 (6), incluindo na bibliographia de sua *Philodryas serra* o trabalho de Duméril & Bibron (5), ao lado da descripção original de Schlegel (3), reproduziu o erro daquelles dois herpetologos, embora houvesse assignalado a presença de escamas dorsaes carinadas somente na especie referida. Por conseguinte, *P. serra* de Günther é tambem um composto.

5. Cope, em 1869 (7), descreveu a especie *Teleolepis striaticeps*, portadora de escamas carinadas desde o dorso até perto da cabeça, conforme, aliás, o proprio nome especifico está a significar. Nestas condições, a especie *striaticeps* é um estricto synonymo de *serra* no conceito de Schlegel.

6. Este mesmo auctor, em 1885 (8), todavia, ao se referir á especie *Philodryas serra* reproduziu o erro commettido por Duméril e Bibron e seguido por Günther, e que constituiu na assimilação de exemplares de escamas carinadas a outros de escamas lisas sob a mesma designação especifica.

7. Boulenger, em 1896 (9), ao redescrever a especie *Philodryas serra*, tornou ainda mais flagrante essa confusão, pelas seguintes razões:

a) Incluiu na bibliographia de *serra*, além do trabalho original de Schlegel (3), as referencias de Duméril & Bibron (5), Günther (6) e Cope (8), as quaes, segundo mostrei, correspondem a duas formas distinctas;

b) assignalou a presença de escamas dorsaes, ora lisas, ora mais ou menos distinctamente carinadas;

c) arrolando seis exemplares então existentes no Museu Britannico e dando o numero de ventraes nelles occorrentes, tornou patente que confundira, sob o nome de *serra*, duas especies distinctas. Sem ter examinado o material arrolado por Boulenger, estou convencido de que os exemplares *c, d, e* devem ter escamas dorsaes carinadas, correspondendo de facto a *P. serra;* mas os exemplares *a, b, f* devem ter escamas dorsaes lisas, correspondendo, pois, a outra especie.

SERIE EXAMINADA

Ao exame comparativo e meticuloso de 110 exemplares existentes na collecção do Instituto Butantan, verifiquei que elles podiam ser divididos em dois grupos. Esses dois grupos são facilmente distinguiveis já á primeira vista, pela presença de escamas dorsaes lisas, em um (86 exemplares) e mais ou menos carinadas, em outro (24 exemplares). Cada um desses grupos corresponde, a meu ver, a uma especie bem definida. De um lado, os portadores de escamas dorsaes mais ou menos carinadas identificam-se com a especie *Philodryas serra* no conceito de Schlegel. De outro lado, os possuidores de escamas dorsaes lisas representam indiscutivelmente uma especie áparte que eu agora designarei sob o nome de

Philodryas pseudo-serra, sp. n.

(Figs. 1-4; Tab. I)

DIAGNOSE DIFFERENCIAL

	P. pseudo-serra	*P. serra*
Cranio:		
a) Rebordo supero-externo do parietal	presente, bem nitido e ligado á articulação parieto-supratemporal.	ausente.
b) Dentes maxillares	14 + 2	13 + 2
c) » palatinos	8, os 2 anteriores pouco maiores	7, os 2 anteriores bem maiores
d) » pterygoideos	16	14
e) » mandibulares	25, dos quaes 13-14 situados antes da ponta do osso articular e 12-11, depois.	21, dos quaes 11-12 situados antes da ponta do osso articular e 10-9, depois.
Pholidose:		
a) Typo de escamas dorsaes	lisas desde a nuca até a base da cauda; eriçadas na ponta da cauda.	carinadas desde a nuca até a base da cauda; carena bem nitida no ♂, cujas escamas supra-anaes (e placas para-anaes) chegam a ser tuberculares; lisas na ponta da cauda.
b) Placas ventraes	178 — 213	226 — 244
c) Placa anal	dupla	dupla (ás vezes, inteira).
d) Placas subcaudaes	88 — 119	98 — 111

DEFINIÇÃO

Morphologia — Colubrideo, Boigineo, opisthoglypho. Corpo e cauda bem alongadas. Cabeça algo distincta do pescoço. Cranio: parietal com o rebordo supero-externo bem nitido e ligado á articulação parieto-supratemporal; dentes maxillares 14, seguidos, após curto diastema, por 2 presas chanfradas; dentes palatinos 8, os 2 anteriores pouco maiores do que os demais; dentes pterygoideos 16; dentes mandibulares 25, dos quaes 13-14 situados para a frente da ponta do osso articular e 12-11, para trás della. *Pholidose*: escamas dorsaes em 21 filas, todas lisas, e com dupla fosseta apicilar; escamas da ponta da cauda eriçadas; placas ventraes arredondadas, em numero de 196; placa anal dupla; placas subcaudaes 112. Olho pouco menor do que metade do comprimento do focinho, que é antes saliente do que truncado. Rostral tão larga quanto alta, a porção visivel de cima cerca de 1/3 da distancia da frontal; internasaes pouco mais curtas do que as prefrontaes; frontal cerca de 1 vez e 1/2 tão longa quanto larga, pouco mais longa do que sua distancia da ponta do focinho e tão longa quanto as parietaes; angulo antero-externo da frontal apenas contiguo (ás vezes separado) ao angulo superior da preocular, que é unica e cujo angulo anterior está bem proximo (quasi contiguo) e ao mesmo nivel do angulo postero-superior da nasal; postoculares 3; temporaes, todas pequenas, esquamiformes, em numero de 2+3; supralabiaes 8, 4.ª e 5.ª contiguas á orbita; 5 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores que são mais longas do que as posteriores.

Hemipenis — Dividido, calyculado e não capitado; calices polygonaes, profundos, sulco bifido, occupado mesialmente por uma crista longitudinal, coberta de numerosos pequenos espinhos; porção calycular interna margeada por 3 filas nitidas de espinhos dispostas parallelamente ao sulco e, de cada lado, até a ponta.

Coloração — Corpo pardo-olivaceo em cima, com grandes manchas vertebraes pardo-negras, transversaes, subquadrangulares, de bordas anterior e posterior geralmente concavas e de bordas lateraes rectilineas, bordas todas claras, as claras inferiores formam de cada lado uma faixa clara longitudinal interrompida, em cada intervallo de 2 manchas; cabeça pardo-olivacea com 5 faixas escuras longitudinaes descontinuas, a mais baixa das quaes atravessa a orbita; labios pardo-alaranjados com manchas negras; ventre pardo-anegrado com estrias longitudinaes amarello-olivaceas; ponta da cauda esbranquiçada nos jovens.

Holotypo — ♀, No. 802 na collecção do Instituto Butantan, procedente de Porto Martins, Estado de São Paulo.

Allotypo — ♂, No. 9633 na collecção do Instituto Butantan, procedente de Hansa, Estado de Santa Catharina: ventraes 193, subcaudaes 102 p.; temporaes 1 + 3.

Paratypos — Constantes da relação abaixo, com as seguintes variações de pholidose: postoculares 3 (ás vezes 2, 4 ou 1); supralabiaes 8 (excepcionalmente 7 ou 9); temporaes 2 + 3 (ás vezes 1 ou 3 + 2 ou 4); ventraes — ♂ ♂ : 181 — 204. ♀ ♀ : 189 — 209; subcaudaes — ♂ ♂ : 102 — 119, ♀ ♀ : 90 — 112.

Nota: — Duméril e Bibron assignalam o limite minimo de 178 ventraes em exemplar que provavelmente é desta especie; e Boulenger, o maximo de 213 ventraes e o minimo de 88 subcaudaes no exemplar *f* do Museu Britannico.

RELAÇÃO DOS EXEMPLARES

Localidade	Sexo	Post-Oc.	Temp.	Sp.-Lab.	E.D.	V.	A.	Sb. C.	
Porto Martins, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	196	2	112	Holotypo
Hansa, Santa Catharina	♂	3/3	1+3	8/8	21	193	2	102	Allotypo
Taubaté, S. Paulo	♂	3/3	1+2	8/8	21	191	2	43+	Paratypo
Remanso, S. Paulo	♂	3/2	1+3/1+2	8/8	21	190	2	114	»
Barão de Ibitinga, S. Paulo ..	♂	3/3	2+3	8/8	21	190	2	112	»
Leme, S. Paulo	♂	3/3	1+3/2+3	8/8	21	192	2	113	»
Pantaleão, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	192	2	102	»
Serpentario	♂	3/3	1+3/2+3	8/8	21	186	2	112	»
»	♀	3/3	2+3	8/8	21	204	2	101	»
»	♂	3/3	1+3	8/8	21	182	2	105	»
Juiz de Fóra, Minas	♂	3/3	2+3	8/7	21	196	2	112	»
Corumbatahy, S. Paulo	♂	2/2	1+3/2+3	8/8	21	187	2	115	»
Mathias Barboza, Minas	♀	3/3	1+3/1+2	8/8	21	201	2	90	»
Queluz (Areias), S. Paulo ..	♀	3/3	1+2/1+3	8/8	21	198	2	100	»
Itoby, S. Paulo	♂	3/3	2+3	7/8	21	182	2	114	»
Tremembé, S. Paulo	♂	3/3	1+3	8/8	21	190	2	107	»
Prata, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	195	2	58+	»
Arpuhy, S. Paulo	♂	3/3	1+3	8/8	21	187	2	111	»
Serpentario	♀	3/3	1+2/2+3	8/8	21	199	2	104	»
Vargem Grande, S. Paulo ...	♀	3/3	2+3	8/8	21	202	2	46+	»
S. Manoel, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	197	2	109	»
Conchas, S. Paulo	♀	3/3	2+3	9/8	21	192	2	103	»
Serpentario	♂	3/3	2+2/2+3	8/8	21	185	2	116	»
Bom Jesus, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	208	2	101	»
Mathias Barboza, Minas	♂	3/3	2+3	8/8	21	198	2	104	»
Nova Odessa, S. Paulo	♀	3/3	2+3	7/8	21	197	2	107	»
Falcão Filho, S. Paulo	♂	3/3	1+2	8/8	21	186	2	109	»
» » » »	♂	3/3	2+3	8/8	21	191	2	110	»
Mogy das Cruzes, S. Paulo ..	♂	3/4	1+2/2+3	8/8	21	191	2	114	»
Retiro, Minas	♀	3/3	2+3	8/7	21	195	2	104	»
Itupéva, S. Paulo	♀	3/3	1+3	8/8	21	200	2	96+	»
Botucatú, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	195	2	112	»

No.	Localidade	Sexo	Post-Oc.	Temp.	Sp.-Lab.	E.D.	V.	A.	Sb. C.
2120	Santa Barbara, Minas	♂	3/3	1+2	8/8	21	191	2	110
2558	Leme, S. Paulo	♂	3/3	2+2	8/8	21	183	2	109
2560	Pirituba, S. Paulo	♂	3/3	1+3	8/7	21	187	2	109
2562	Vargem Grande, S. Paulo ...	♀	3/3	2+2/1+3	8/8	21	197	2	102
2563	Butantan, S. Paulo	♂	3/3	1+2/1+3	8/8	21	191	2	117
3337	Serpentario	♂	3/4	2+3	8/8	21	204	2	106
3572	»	♂	3/3	2+3	8/8	21	199	2	105
4320	Cayeiras, S. Paulo	♀	3/3	1+3	8/8	21	195	2	107
9223	?, Estação do Norte	♂	3/3	1+3/2+3	8/8	21	191	2	107
9227	Jaraguá, Santa Catharina	♀	3/3	1+2	8/8	21	197	2	96
9230	Hansa, Santa Catharina	♂	3/3	2+2/2+3	8/8	21	186	2	115
9260	Carvalho Araujo, S. Paulo	♀	3/3	2+3/1+3	8/8	21	199	2	100
9262	Araguaya, Espirito Santo	♀	3/3	2+3	8/8	21	201	2	105
9263	» » »	♂	3/3	1+3	8/8	21	191	2	110
9264	» » »	♂	3/3	2+3	8/8	21	185	2	104
9281	Hansa, Santa Catharina	♀	3/3	1+3	8/8	21	196	2	105
9283	Araguaya, Espirito Santo	♂	3/3	1+2/1+3	8/8	21	200	2	115
9285	Hansa, Santa Catharina	♂	3/3	1+2/1+3	8/8	21	186	2	112
9286	Alfredo Maia, Espirito Santo	♂	3/3	1+2	8/8	21	194	2	56+
9295	Araguaya, Espirito Santo . .	♀	3/3	3+3/2+3	8/8	21	203	2	105
9363	» » »	♂	3/3	2+3	8/8	21	194	2	116
9376	» » »	♂	3/3	2+4/2+3	8/8	21	190	2	102
9379	Rio Claro, Rio de Janeiro ...	♂	3/3	2+2/2+4	8/8	21	197	2	118
9381	Araguaya, Espirito Santo	♀	3/3	2+3	8/8	21	209	2	106
9417	Morro Azul, Rio de Janeiro	♀	3/3	3+3	8/8	21	189	2	108
9444	Mogy das Cruzes, S. Paulo ..	♂	3/3	1+2/1+3	8/8	21	191	2	111
9445	Araguaya, Espirito Santo	♂	3/3	1+3/2+3	8/8	21	189	2	111
9502	Serra Azul, Paraná.	♂	3/3	1+3	8/8	21	189	2	74+
9542	Areal, Rio de Janeiro	♂	3/3	2+3	8/8	21	193	2	64+
9576	Piquete, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	206	2	100
9581	Pedra Corrida, Minas	♀	3/3	1+3/2+4	8/8	21	192	2	101
9594	Barão Homem de Mello, Rio	♂	3/3	2+3/1+2	8/8	21	199	2	114
9595	Mendes, Rio de Janeiro	♀	3/3	2+3	8/8	21	201	2	107
9609	Suzano, Minas	♀	3/3	2+3	8/8	21	205	2	109
9616	Baruery, S. Paulo	♀	3/3	2+3	8/8	21	204	2	94
9619	Areal, Rio de Janeiro	♀	3/3	2+3	7/8	21	200	2	108
9629	Rio Claro, Rio de Janeiro ...	♀	3/3	2+3	9/8	21	196	2	66+
9639	Campo Limpo, S. Paulo	♂	3/3	2+3	8/8	21	181	1	111
9662	Baruery, S. Paulo	♀	3/3	1+2/2+3	8/8	21	191	2	106
9663	» » »	♀	3/3	2+4	8/8	21	190	2	107
9665	Rio Claro, Rio de Janeiro ...	♀	3/3	2+3	8/8	21	208	2	104
9666	Porto das Flores, Minas	♀	3/3	2+3	7/7	21	200	2	105
9684	Araguaya, Espirito Santo ...	♀	3/3	2+3	8/8	21	200	2	107
9693	Mogy das Cruzes	♂	3/3	2+3	8/8	21	199	2	106
9695	Rio Claro, Rio de Janeiro ..	♂	3/3	2+3/2+2	8/8	21	191	2	119
9703	Hansa, Santa Catharina	♂	3/3	2+3/1+2	8/8	21	189	2	112



Localidade	Sexo	Post-Oc.	Temp.	Sp.-Lab.	E.D.	V.	A.	Sb. C.	
Eugenio Lefèvre, S. Paulo ..	♀	3/3	1+2/2+3	8/8	21	205	2	106	Paratypo
Homem de Mello, Rio de Jan.	♀	3/3	2+3	8/8	21	198	2	106	»
Sampaio Moreira, S. Paulo ..	♂	3/3	2+3	8/8	21	195	2	112	»
Hansa, Santa Catharina	♂	3/3	1+2	8/8	21	190	2	113	»
Engenheiro Cesar, S. Paulo ..	♂	1/1	2+3	8/8	21	194	2	64p.+n.	»
Sitio, Minas	♀	3/3	3+4/2+3	8/8	21	208	2	101	»
Cons.º Zacarias, Paraná	♂	3/3	2+3	8/8	21	193	2	105	»
Araguaya, Espirito Santo	♂	3/3	2+3	8/8	21	187	2	115	»

Distribuição — Esta especie occorre no districto centro-meridional do Brasil, desde a Serra do Mar até o planalto dos Estados de Espirito Santo, Minas Geraes, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catharina (zonas dos campos e das florestas orientaes).

Comprimento maximo: No. 9666 = total: 1.185 mm. (cauda: 230 mm).

RESUMO

A' luz de uma revisão que acaba de ser feita, a especie de Colubrideo Boigineo *Philodryas serra* (Schlegel, 1837) Boulenger, 1896 é subdividida em: *P. serra* (Schlegel, 1837), com escamas dorsaes asperas e *P. pseudo-serra* Amaral, 1937, com escamas dorsaes lisas.

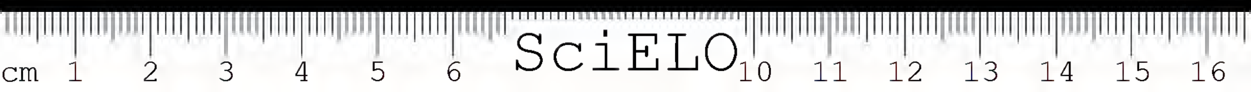
ABSTRACT

In the light of a revisionary study which has just been finished the form of Colubridae Boiginae *Philodryas serra* (Schlegel, 1837) Boulenger, 1896 is split into two species, namely: *P. serra* (Schlegel, 1837), bearing keeled dorsal scales and *P. pseudo-serra* Amaral, 1937, bearing smooth dorsal scales.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Contribuição ao Conhecimento dos Ophidios do Brasil. VIII. Lista Remissiva dos Ophidios do Brasil (2.ª edição) *in* Mem. Inst. Butantan **10**:142.1936.
2. *Boulenger, G. A.* — Cat. Sn. Brit. Museum **3**:134.1896.
3. *Schlegel, H.* — Ess. Physion. Serp. **1**(2):150 *et* **2**:180 tab. VII: 1 & 2. 1837.
4. *Fitzinger, L.* — Syst. Rept. **1**:26.1843.
5. *Duméril, A. & Bibron, G.* — Erpét. Gén. **7**:1113.1854.
6. *Günther, A.* — Cat. Col. Sn. :125.1858.
7. *Cope, E. D.* — Proc. Amer. Philos. Soc. **11**:153.1869.
8. *Cope, E. D.* — *loc. cit.* **22**:192.1885.
9. *Boulenger, G. A.* — Cat. Sn. Brit. Museum **3**:134.1896.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

598.1281

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DOS OPHIDIOS DO BRASIL

10. Redescripção de *Philodryas serra* (SCHLEGEL, 1837)

POR

AFRANIO do AMARAL

No trabalho anterior, mostrei que, á luz da bibliographia ophiologica, a especie redescripta em 1896 por Boulenger, sob o nome de *Philodryas serra*, é realmente um composto das 2 formas seguintes: *Herpetodryas serra* SCHLEGEL, 1837, e a nova especie *Philodryas pseudo-serra*, por mim agora descripta. Accentuei tambem que a fusão de exemplares de caracteres differentes em uma só especie representa um erro commettido em primeiro logar por Duméril e Bibron, em 1854.

Para rectificar esse erroneo conceito de Duméril e Bibron, repetido por Günther, Cope e Boulenger, para só citar os principaes herpetologos envolvidos no caso daquella fusão, é que fui levado a descrever a nova especie *P. pseudo-serra* (SCHLEGEL, 1837), o que faço agora.

Resta-me, portanto, para completar a revisão do assumpto, redescrever a especie.

Philodryas serra (SCHLEGEL, 1837)
(Figs. 1—4; Tab.).

Herpetodryas serra Schlegel, 1837 — Ess. Physion. Serp. **2**:180. tab. 7:112.
Dryophylax serra Dm. & Bibr., 1854 — Erp. Gén. **7**:1113 (*pro parte*).
Philodryas serra Günther, 1858 — Cat. Col. Sn.:125 (*pro parte*).

Teleolepis striaticeps Cope, 1869 — Proc. Amer. Philos. Soc. **11**:153.
Dryophylax serra Jan, 1879 — Icon. Gén. Oph. 49. tab. 4:11 (*pro parte*).
Tropidodryas serra Cope, 1885 — *loc. cit.* **22**:192 (*pro parte*).
Philodryas serra Boulenger, 1896 — Cat. Sn. Brit. Mus. **3**:134 (*pro parte*).
Philodryas serra Amaral, 1936 — Mem. Inst. Butantan **10**:142. 1936 (*pro parte*).

Morphologia — Colubrideo, Boigineo, opisthoglypho. Corpo e cauda longos, corpo mais longo e mais fino do que em *P. pseudo-serra*. Cabeça algo distincta do pescoço. Cranio: parietal sem rebordo, supero-externo ligado á articulação parieto-supratemporal; dentes maxillares 13, seguidos, após curto diastema, por 2 presas chanfradas; dentes palatinos 7, os 2 anteriores bem maiores do que os demais; dentes pterygoideos 14; dentes mandibulares 21, dos quaes 11-12 situados antes da ponta do osso articular e 10-9, para trás della.

Pholidose — Escamas dorsaes em 21 filas, todas carinadas, carena bem nitida nos ♂♂, cujas escamas supra-anaes (e as placas para-anaes), chegam a ser tuberculares; escamas com dupla fosseta apicillar; escamas da ponta da cauda lisas; placas ventraes arredondadas, em numero de 226 — 244 (♂♂ :226 — 236; ♀♀ : 228 — 244); placa anal dupla (ás vezes, unica); placas subcaudaes 98 — 111 (♂♂ : 101 — 111; ♀♀ : 98 — 103). Olho pouco menor do que metade do focinho, que é antes truncado. Rostral um pouco mais larga do qua alta, a porção visivel de cima cerca de 1/4 — 1/5 da distancia da frontal; internasaes pouco mais curtas do que as prefrontaes; frontal cerca de 1 vez e 1/2 a 1 vez e 2/3 tão longa quanto larga, tão longa ou um pouco mais longa do que sua distancia da extremidade do focinho e tão longa ou um pouco mais curta do que as parietaes; angulo antero-externo da frontal geralmente bem contiguo ao angulo superior da preocular, que é ás vezes dupla e cujo angulo anterior está afastado e em nivel inferior ao angulo postero-superior da nasal (em *P. pseudo-serra* não existe tal desnivelamento, porque cada prefrontal não ultrapassa, sobre o lado infero-externo, a borda superior da nasal, conforme acontece em *P. serra*); postoculares 3; temporaes esquamiformes, 2 + 3 ou 2 a 3 + 4; supralabiaes 8, 4.ª e 5.ª contiguas ao olho; 5 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores que são mais longas do que as posteriores.

Hemipenis — Dividido, calyculado e não capitado; calices sub-polygonaes, razos, sulco bifido, occupado mesialmente por uma crista longitudinal, coberta de numerosos pequenos espinhos; porção calycular interna margeada por 1 fila bem nitida de espinhos dispostos parallelamente ao sulco e, de cada lado, até

Coloração — Corpo pardacento em cima, com grandes manchas vertebraes pardo-chocolate, quadrangulares, de bordas em geral rectilineas e mais claras; cabeça parda, com 5 faixas escuras longitudinaes descontinuas, a mais baixa das quaes atravessa a orbita; labios pardo-alaranjados com manchas negras; ventre pardacento, geralmente côr de tijolo, salpicado ou manchado de negro; ponta da cauda esbranquiçada nos jovens.

Distribuição — Esta especie occorre nos districtos nordestino, central e centro-meridional, desde a faixa littoreana até os contrafortes da Serra do Mar (zonas maritima e das florestas orientaes).

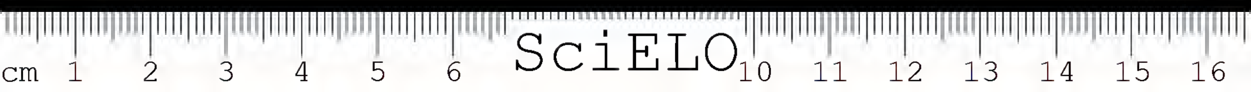
RESUMO

Redescreve-se a especie de Colubrideo Boigineo *Philodryas serra* (Schlegel, 1837), depois de desmembrados os exemplares portadores de escamas dorsaes lisas, nella erroneamente incluidos por Duméril e Bibron, em 1854, Günther, em 1858, Cope, em 1885 e Boulenger, em 1896. Estes exemplares pertencem á especie *P. pseudo-serra* Amaral, 1937.

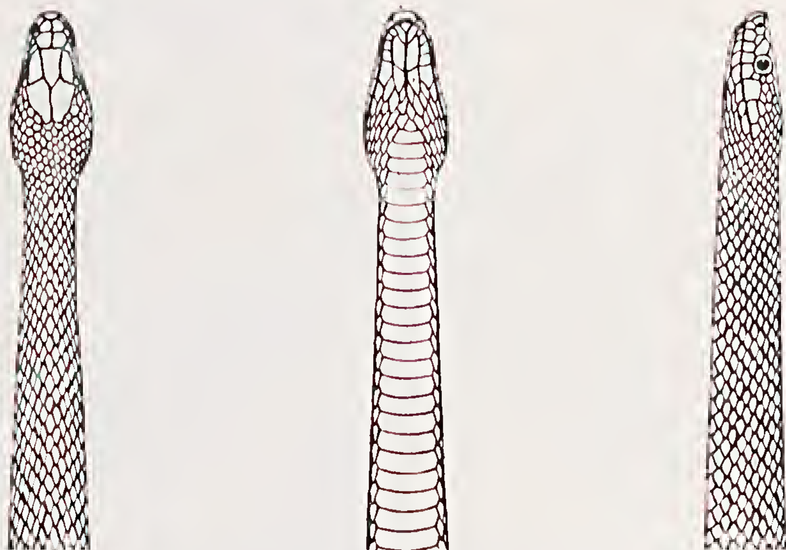
ABSTRACT

The species of Colubridae Boiginae *Philodryas serra* (Schlegel, 1837) is redescribed following the elimination of all specimens bearing smooth dorsal scales which had erroneously been included in it by Duméril and Bibron in 1854, Günther in 1858, Cope in 1885 and Boulenger in 1896. Such specimens belong to the species *P. pseudo-serra* Amaral, 1937.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).

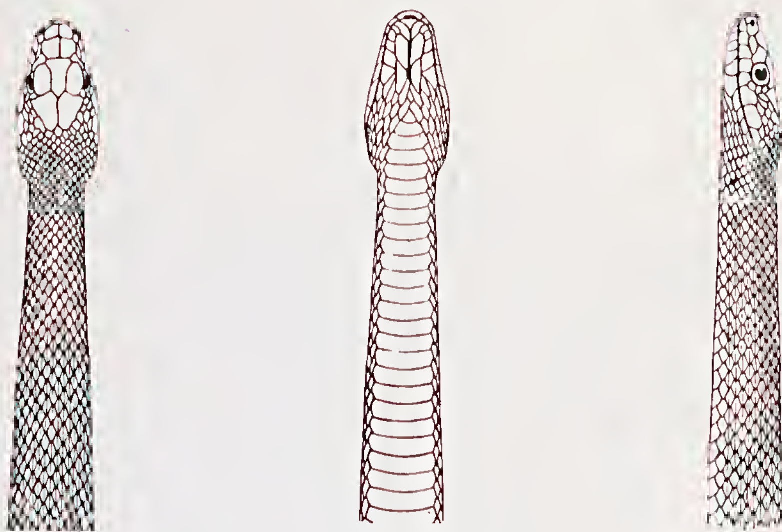

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937



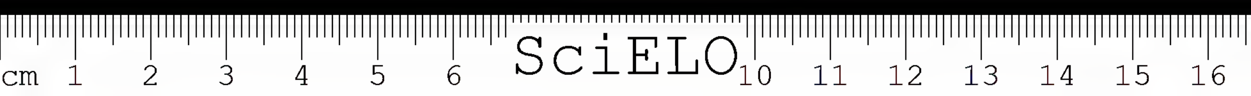


Philodryas pseudo-serra, sp. n.





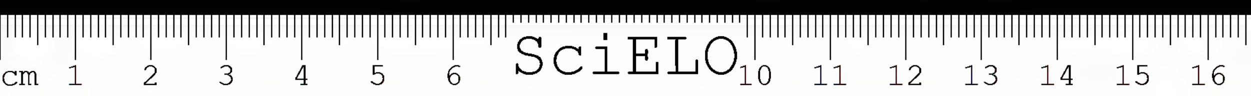
Philodryas serra (Schlegel, 1837)

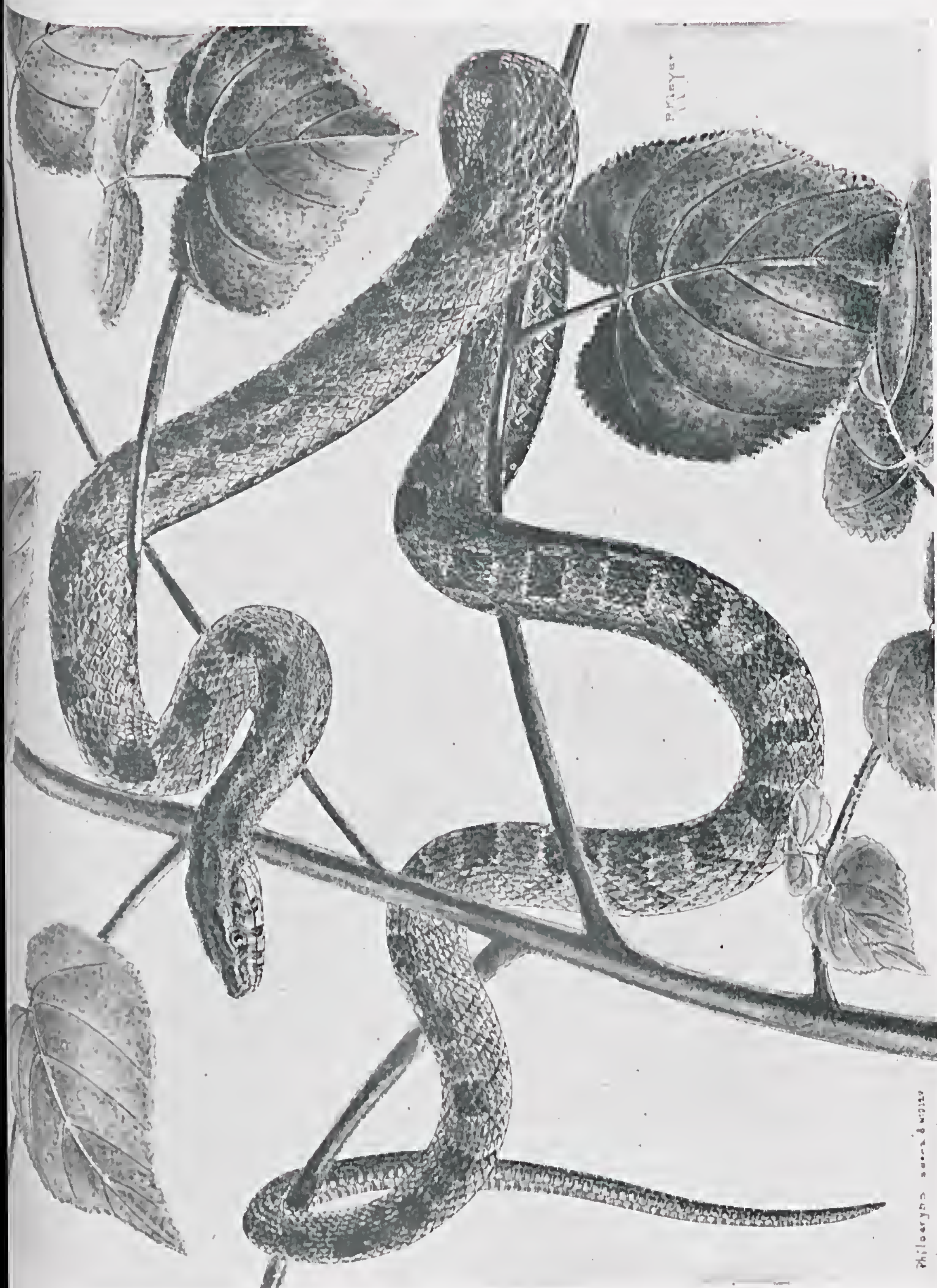

cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937

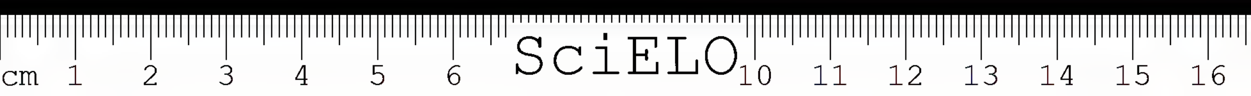


Philodryas pseudo-serra


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16



Philodryas serra


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

598.128.1

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DOS OPHIDIOS DO BRASIL

11. Synopse das Crotalideas do Brasil

POR

AFRANIO DO AMARAL

(Com 29 gravuras no texto)

1.ª PARTE

As serpentes solenoglyphas estiveram, durante muitos annos, reunidas numa só familia, sob a denominação de *Viperidae*. Este grupo, criado em 1840 por Bonaparte (*in* Mem. Accad. Torino 2.2:393), prevaleceu até os fins do seculo passado, quando Boulenger, o grande especialista do Museu Britannico, ainda o reconheceu (*in* Cat. Sn. Brit. Mus.3:463 *et* 518.1896) como uno. Isto occorreu, apesar de varios auctores já haverem precedentemente proposto, em termos acceitaveis pelas Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, a divisibilidade do alludido grupo em 2 familias bem distinctas. Assim é que, para uma destas, Fitzinger, em 1843 (*in* Syst. Rept.:28), criara o nome *Chersophes* e, para a outra, a denominação *Bothrophes*. Sem falar em outras designações que não podem ser reconhecidas pelo codigo internacional de nomenclatura, diversos nomes foram applicados a estas 2 familias. Delles, *Viperidae* e *Crotalidae*, criados por Cope, respectivamente, em 1859 (*in* Proc. Acad. Nat. Sc. Philadelphia:333) e 1864 (*in loc. cit.*:231) receberam, durante muito tempo, a preferencia dos herpetologos.

As 2 familias *Viperidae* e *Crotalidae* incluiam grande numero de formas que facilmente se reunem nos 2 distinctos grupos correspondentes, a saber:

A. Fosseta lacrimal ausente; osso maxillar não escavado em cima .... 1.ª familia.



B. Fosseta lacrimal presente; osso maxillar escavado em cima .... 2.ª familia.

Sob o ponto de vista da systematica, estes 2 grupos poderiam ficar subordinados a uma superfamilia, caracterizada pela verticalidade dos ossos maxillares e para a qual seria cabivel o nome *Crotaloideae*, proposto por Stejneger (*in* Bull. 58 U. S. Nat. Mus.:256.1907). Cabe, porém, accentuar que Stejneger, ao erigir aquella superfamilia, mostrara (*in loc. cit.*:442) que a denominação *Viperidae* não podia prevalecer na nomenclatura, porque o nome generico *Vipera*, que lhe dera origem, fora criado somente em 1768 por Laurentius (*in* Syn. Reptilium:99) e é synonimo de *Coluber*, criado por Linneu (*in* Syst. Nat. 1:216.1758), com antecedencia de uma decada. Sem embargo disto e em virtude da confusão que resultaria da fixação do nome *Coluber* como typo dessa familia de serpentes solenoglyphas (a qual teria de receber a denominação de *Colubridae*, já preoccupada por um grupo de serpentes desprovidas de presa inoculadora), Stejneger criou o nome *Cobridae*, cujo genero typico é *Cobra* Laurentius, 1768 (*in loc. cit.*:103), tomado, *in sensu strictiore*, como synonymo de, e preexistente a, *Bitis* Gray, 1842 (*in* Zool. Miscell.:25 *et* 69).

Dessa discussão da materia resulta que as serpentes solenoglyphas (superfamilia *Crotaloideae*), caracterizadas pela posse de maxillares verticaes, se agrupam em 2 familias, a saber:

A. Fosseta lacrimal ausente; osso maxillar não escavado em cima .... *Cobridae*

B. Fosseta lacrimal presente; osso maxillar escavado em cima .... *Crotalidae*

Destas familias, a 1.ª (*Cobridae*) não tem representantes no hemispherio occidental, isto é, nas regiões nearctica e neotropica. A 2.ª (*Crotalidae*), todavia, é quasi caracteristica desta parte do mundo, porque, embora possua representantes em outras regiões, a maioria destes occorre nas Americas.

A familia *Crotalidae* subdivide-se em 2 subfamilias reconhecidas desde Cope (*in* Rept. U. S. Nat. Mus.:1131.1898), assim:

a) presença de appendice caudal articulado ("crepitaculum") .... *Crotalinae*.

b) ausencia de appendice caudal articulado .... *Lachesinae*.

Não só na região neotropica, como na região nearctica, occorrem representantes destes 2 subgrupos, havendo do 2.º formas tambem na região palearctica.

Da subfamilia *Crotalinae* fazem parte dois generos, assim reconheciveis:

1. Topo da cabeça coberto de escamas maiores ou menores, algumas escutiformes .... *Crotalus* LINNEU, 1758.

2. Topo da cabeça coberto de escudos bem configurados .... *Sistrurus* GARMAN, 1883.

Do genero *Crotalus*, que é peculiar ao hemispherio occidental, occorrem representantes nas duas regiões, neotropica e nearctica. O genero *Sistrurus* é por bem dizer typico da região nearctica, pois apenas uma de suas especies (*S. ravus*) se encontra no Mexico oriental e, pois, bem pouco para fóra da divisa meridional, aliás pouco nitida, daquella zona.

A subfamilia *Lachesinae* comprehende tres generos, que assim se distinguem:

1. Topo da cabeça coberto de escudos configurados .... *Agkistrodon* BEAUVOIS, 1799.

Este genero tambem occorre na região palearctica e, no nosso hemispherio, nas regiões nearctica e neotropica, mas seu unico representante neotropico (*A. bilineatus*) só se distribue do Mexico até Honduras.

2. Topo da cabeça coberto de escamas ou escudos irregulares:

2a. Escamas supracephalicas granulosas, escamas dorsaes com carena tubercular; escamas da ponta da cauda longas e espinhosas .... *Lachesis* DAUDIN, 1803.

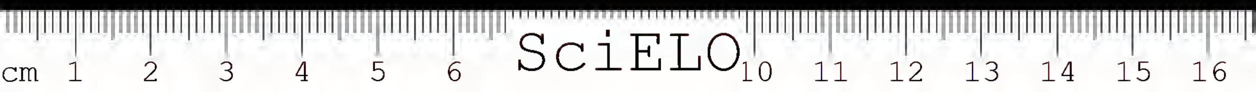
2b. Escamas supracephalicas chatas e carinadas; escamas dorsaes em carena mais ou menos alongada; escamas da ponta da cauda não distinctas das demais .... *Bothrops* WAGLER, 1824.

Estes dois generos são exclusivos da região neotropica.

Por mero desconhecimento da materia, muitos auctores confundem sob a só denominação de *Lachesis* as formas componentes desses 2 generos acima, os quaes, segundo mostrei em 1926 (*in* Rev. Mus. Paulista **14**:39-40), se apartam fundamentalmente ainda pelos seguintes caracteres, de indiscutivel valor taxonomico:

a) dentes pterygoideos, cuja série ultrapassa a articulação transverso-pterygoidea nas especies de *Bothrops* e não a ultrapassa na especie unica de *Lachesis*;

b) pulmão tracheal, que occorre nas varias especies de *Bothrops* e não comparece, nem sob forma vestigial, na especie unica de *Lachesis*:



e) systema de reproducção, que é ovo-viviparo nas varias especies de *Bothrops* e oviparo na especie unica de *Lachesis*, segundo mostrei em 1927 (*in* Rev. Mus. Paulista **15**:43-45).

A' luz da systematica é, portanto, erro, e erro crasso, incluir no genero *Lachesis* certas serpentes solenoglyphas, como a Jararaca, a Jararacussú, a Urutú e outras especies affins, cujos caracteres satisfazem, no mais alto grau, á definição de *Bothrops*. (*)

2.ª PARTE

Esclarecidos, desse modo, os pontos mais importantes da systematica das Crotalideas em geral, passemos a assignalar synopticamente a differenciação das especies occorrentes no Brasil.

Definição:

Serpentes relativamente grossas, de escamas asperas, de cabeça distincta (bem mais larga do que o pescoço), de cauda curta, de pupilla vertical (conformada á vida nocturna), providas de 2 grandes presas moveis na parte antero-superior da bocca e caracterizadas particularmente, assim pela presença de escavação superior nos ossos maxillares, como pela posse de um orificio (fosseta lacrimal) entre a narina e a orbita, á maneira de uma narina supplementar de cada lado, donde decorre a denominação de "cobras de 4 ventas", que lhes dá o povo.

Differenciação:

+. Presença de appendice caudal articulado ("crepitaculum"): chocalho ou guizo (Fig. A) .... subfam. *Crotalinae*:



Fig. A

I. Topo da cabeça com escamas irregulares, ás vezes scutiformes sobre o focinho (Fig. B) .... gen. *Crotalus* LINNEU, 1758.

(*) Esse erro fundamental, de assimilação das especies de *Bothrops* no genero *Lachesis*, ainda recentemente foi perpetrado por J. Vellard *in* Bol. Sec. Agric. Ind. Com. Pernambuco 1 (1) :30. 1936 et 2 (2) :192 et seq.. 1937.



Fig. B

Especie unica no Brasil (Fig. 1)
C. terrificus (LAURENTIUS, 1768)

Nota: Esta especie é representada no Brasil pela raça *Crotalus terrificus terrificus*, da qual, em 1927 (*in* Rev. Mus. Paulista **15**:89-91) registei duas variedades, a saber:

a) marcas nucaes sob a forma de losangos .... *collirhombeatus*

b) marcas nucaes sob a forma de 2 faixas lineares longitudinaes .... *collilineatus*. (**)

Nomes vulgares: Cascavel; Cascavel de quatro ventas (nordeste); Boicininga ou Boiçununga e Maracá (Amazonia). Boiquira (sul), Maracaboia (centro).

Distribuição geographica: Forma commum a todas as zonas seccas do país, especialmente abundante no centro e nordeste e relativamente rara no extremo sul.

A esta sub-differenciação, que parece ainda estar em vias de constituição, corresponde um caracter chromatico predominante no veneno de cada uma dellas: a var. *collirhombeatus*, que occorre sobretudo no nordeste, possue um veneno *quasi sempre* amarellado, ao passo que a var. *collilineatus*, que se encontra sobretudo no sul, apresenta um veneno de côr *quasi sempre* esbranquiçada. Sendo a côr do veneno funcção de sua composição chimica (segundo mostrei *in* Bull. Antivenin Inst. America **3**:7.1929), pode-se acceitar a forma nordestina como uma especie physiologica bem distincta da especie physiologica representada pela forma meridional.

++. Ausencia de appendice caudal articulado. subfam. *Lachesinae*:

I. Topo da cabeça com escamas granulosas (Fig. C.); escamas dorsaes com carena tubercular (Fig. D); escamas da ponta da cauda longas e espinhosas (Fig. E).. gen. *Lachesis* DAUDIN, 1803:

Especie unica do genero (Fig. 2)........ *L. muta* (LINNEU, 1766).

Nomes vulgares: Surucucú (Amazonia e centro), Surucucú de fogo (nordeste), Surucucú pico de jaca (Bahia). Surucutinga ou Surucucutinga (centro e sudeste).

(**) Recentemente, Klauber, talvez por não haver comprehendido o que eu escrevi em vernaculo naquella Revista (p. 90), applicando eu esses dois nomes a "variedades", fez crer que eu lhes dera valor especifico.



Fig. C



Fig. D



Fig. E

Distribuição geographica: Especie encontrada na região propriamente tropical, onde habita as matas e florestas.

II. Topo da cabeça com escamas chatas e carinadas (Fig. F); escamas dorsaes com carena alongada (Fig. G); escamas da ponta da cauda não distinctas das demais (Fig. H) .... gen. *Bothrops* WAGLER, 1824:



Fig. F

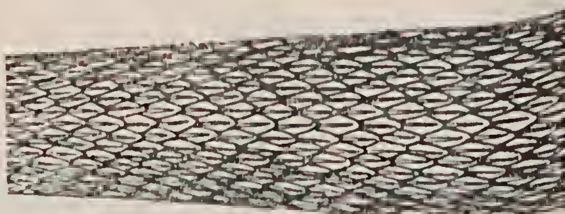


Fig. G

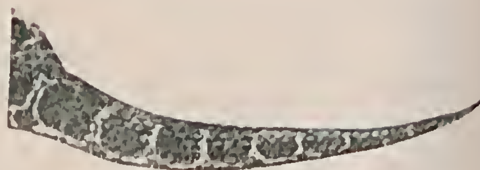


Fig. H

IIA. Cauda prehensil (Fig. I):



Fig. 1

1. Placas subcaudaes quasi todas inteiras, em numero de 71 a 83; colorido do dorso cinzento com faixas transversaes castanho-escuras, bifidas e a terminarem em 2 pontos negros de cada lado; colorido do ventre pardacento com manchas amarellas um pouco esparramadas sobre os flancos (Fig. 3) .... *B. castelnaudi* D. et B., 1854.

   Distribuição geographica: Especie rara, dendricola accidental, procedente das zonas septentrional e centro-occidental.

2. Placas subcaudaes quasi todas divididas, em numero de 56 a 71; colorido do dorso verde, com uma série de pintas amarello-avermelhadas de cada lado da linha vertebral e com uma lista punctiforme de côr amarella de cada lado do ventre (Fig 4) .... *B. bilineata* (WIED, 1825).

   Nomes vulgares: Surucucú de patioba, Surucucú de pindoba e Patioba (sul da Bahia), Ouricana e Uricana e Surucucú pinta de ouro (sertão da Bahia), Jararaca verde (centro até Espirito Santo).
   Distribuição geographica: Especie dendricola, propria á Bahia e outros districtos da zona hygrophila tropical.

IIB. Cauda semi-prehensil (Fig. J):



Fig. J

a. Placas subcaudaes divididas em geral, mas com nitida tendencia á união, em numero de 48 a 65; colorido do dorso pardo-amarellado, com marcas lateraes subtriangulares ou irregulares e com o centro claro (Fig. 5) .... *B. insularis* (Amaral, 1921).

Nome vulgar: Jararaca ilhoa.

Distribuição geographica: Especie semi-dendricola, confinada á Ilha da Queimada Grande (littoral de S. Paulo).

IIC. Cauda não prehensil (Fig. K):



Fig. K

IIC' Placas subcaudaes quasi todas divididas:

IIC'a. Borda anterior da fosseta lacrimal formada pela 2.ª supra-labial (Fig. L):

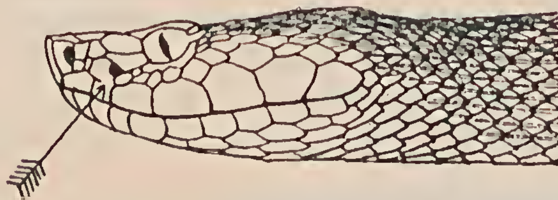


Fig. L

1. Supralabiaes geralmente 7; escamas dorsaes fortemente carinadas (carena curta e subtubercular) em 23 a 33 filas; ventraes 180 a 231; colorido do dorso roseo-pardacento com estreitas manchas lateraes angulares, ligadas de leve a 2 pintas negras paraventraes (Fig. 6) .... *B. atrox* (Linneu, 1758).

Nomes vulgares: Caissaca (nordeste) e Jararaca (norte).

Distribuição geographica: Especie terrestre encontrada em toda a zona tropical até S. Paulo.

2. Supralabiaes 8; escamas dorsaes fortemente carinadas, em 25 filas; ventraes 164 a ?; colorido do dorso cinzento amarellado com estreitas manchas lateraes angulares, ligadas de leve a 2 pintas negras para-ventraes (Fig. 7) .... *B. neglecta* AMARAL, 1923

Distribuição geographica: Especie terrestre, oriunda da Bahia.

3. Supralabiaes geralmente 8; escamas dorsaes fracamente carinadas (carena longa e baixa), em 20 a 27 filas; ventraes 175 a 216; colorido do dorso verde-olivaceo, com estreitas manchas lateraes sub-triangulares ou irregulares, geralmente confluentes com 2 pintas negras paraventraes (Fig. 8) .... *B. jararaca* (WIED, 1824).

Nomes vulgares: Jararaca, Jaraca ou Jaracá, Jararaca dormideira, Jararaca preguiçosa, Jararaca da mata virgem, Jararaca do cerrado e Jararaca do campo.

Distribuição geographica: Especie terrestre, distribuida da Bahia para o sul e communnissima especialmente no Paraná e Santa Catharina.

Nota: Segundo mostrei alhures (*in* Contrib. Harvard Inst. Trop. Med. & Biol. **2**:26.1925), a nossa Jararaca foi confundida com a "Fer-de-lance" da Martinica por Boulenger (*in* Cat. Sn. Brit. Mus. **3**:535.1896) sob o nome de *Lachesis lanceolatus*, o que levou muitos auctores, mesmo brasileiros, a lhe applicarem este nome. Ora, como a serpente da Martinica (*lanceolatus*), descripta por Lacepède em 1789, é um estricto synonymo da especie *atrox*, descripta por Linneu em 1758 e á qual corresponde a nossa Caissaca, cuja nitida separação da Jararaca foi entre nós de ha muito estabelecida, não se comprehende a razão de se terem aqui applicado a estas especies dois nomes scientificos, que afinal representam uma só e mesma forma. Denominar a nossa Jararaca de *Lachesis lanceolatus* é imperdoavel, porquanto não corresponde á especie *lanceolatus* (= *atrox*), nem se pode ligar ao genero *Lachesis*.

4. Supralabiaes geralmente 8; escamas dorsaes nitidamente carinadas (carena sublonga e alta), em 23 a 27 filas; ventraes 170 a 186; colorido do dorso amarello-escuro com largas (bem abertas) manchas lateraes ligadas de leve a (jovens), ou confluentes com (adultos), 2 pintas negras para-ventraes (Fig. 9) .... *B. jararacussu* LACERDA, 1884.

   Nomes vulgares: Jararacussú ou Jararacussú verdadeiro, Jararacussú malha de sapo, Cabeça de sapo ou Patrona (Bahia e nordeste), Jararacussú tapete, Urutú dourado, preto, amarello ou estrella e Surucueú dourado (Rio de Janeiro e sudeste de Minas Geraes).

   Distribuição geographica: Especie semi-aquatica, encontradiça á beira de brejos e correntes nas zonas baixas desde o littoral do sul e leste até o centro-oeste.

5. Supralabiaes 8; escamas dorsaes nitidamente carinadas (carena longa e alta) em 27 filas; ventraes 164 a 167; colorido do dorso amarello-pardacento com estreitas manchas lateraes, confluentes a 2 pintas paraventraes (Fig. 10) .... *B. pirajai* AMARAL, 1923.
   Distribuição geographica: Especie procedente do sul da Bahia.

IIC'b. Borda anterior do fosseta lacrimal separada da 2.ª supralabial (Fig. M).



Fig. M

1. Supralabiaes 8 a 11; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa) em 29 a 35 filas; ventraes 165 a 190; colorido do dorso pardacento com grandes ocellos lateraes, por vezes confluentes longitudinal ou transversalmente; topo da cabeça annegrado, com um desenho esbranquiçado, mais ou menos irregular, ao centro (Fig. 11) .... *B. alternata* D. et B., 1854.

Nomes vulgares: Urutú, Cruzeiro ou Cruzeira, Cotiara ou Coatiara e Jararaca rabo de porco (extremo sul) ou Jararaca de agosto (região da Lagoa dos Patos) .

Distribuição geographica: Especie terrestre, propria da zona serrana, desde o sudeste de Minas Geraes, através de S. Paulo e até Rio Grande do Sul.

2. Supralabiaes 8 a 9; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa), geralmente em 27 filas (25 a 29); ventraes 152 a 165; colorido do dorso verde-olivaceo com manchas lateraes pardo-negras sub-triangulares, cada ponta correspondente e superposta a uma pinta negra para-ventral; topo da cabeça annegrado, com um desenho esverdeado claro, em forma de dupla cruz, mais ou menos irregular, ao centro (Fig. 12) .... *B. cotiara* (GOMES, 1913).

Nomes vulgares: Cotiara ou Coatiara, Boicotiara (S. Paulo e Paraná), Jararaca preta (centro de Santa Catharina).

Distribuição geographica: Especie terrestre, encontrada na zona serrana do sudeste de Minas Geraes, sudoeste do Rio de Janeiro e nordeste de S. Paulo e, depois, do Paraná para o sul.

3. Supralabiaes 8; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa) em 25 a 27 filas, ventraes 150 a 160; focinho não truncado, nem recurvo; colorido do dorso roseo ou tijolo em series de pintas lateraes negras, simples ou duplas e superpostas; topo da cabeça rubro-pardo, geralmente com manchas annegradas, sendo 1 impar, anterior sobre o focinho (inter-canthal) e 2 ou 3 pares posteriores, geralmente fundidos em forma de uma estria parietal de cada lado (Fig. 13) .... *B. itapetiningae* (BOULENGER, 1907).

Nome vulgar: Cotiarinha.

Distribuição geographica: Especie propria ao interior de S. Paulo e Paraná.



4. Supralabiaes 7 a 8; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa), em 19 a 21 series; ventraes 139 a 158; focinho algo truncado e recurvo para cima; colorido do dorso pardo avermelhado, com manchas lateraes escuras, triangulares, proximas entre si; topo da cabeça pardo com 1 faixa clara transversal sobre o focinho e 1 marca tambem clara, em forma de *8* irregular, na região fronto-parietal (Fig. 14) .... *B. erythromelas* AMARAL, 1928.

Distribuição geographica: Especie terrestre, propria dos districtos aridos da zona nordestina (da Bahia ao Ceará).

5. Supralabiaes 8 ou 9, sendo mais longa a 4.ª; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa), em 21 a 25 series; ventraes 160 a 170; focinho semi-pontudo; subocular separada das supralabiaes por 1 serie de escamas; colorido do dorso pardo com faixas transversaes escuras; topo da cabeça escuro com uma ponta clara irregular sobre a coroa (Fig. 15) *B. iglesiasi* AMARAL, 1923.

Distribuição geographica: Especie procedente do sertão do Piauhy.

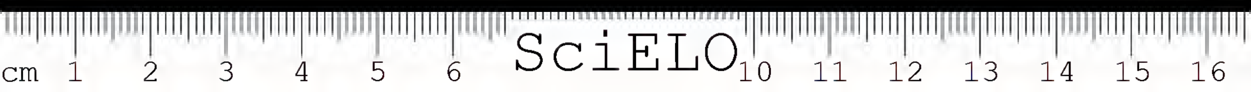
6. Supralabiaes 8 a 9, sendo mais longas a 3.ª e 4.ª; escamas dorsaes distinctamente carinadas (carena longa e baixa), em 21 a 27 series; ventraes 163 a 187; focinho semi-pontudo; subocular separada das supralabiaes por 2 a 3 series de escamas; colorido do dorso variavel, desde o oliva ao rosco, com manchas lateraes irregulares, escuras e tarjadas de branco, oppostas, alternadas ou confluentes ás do outro lado e rodeadas de pintas (manchas menores) de igual colorido; topo da cabeça pardacento com 3 a 5 marcas, sendo 1 impar sobre o focinho (inter-canthal) e 1 a 2 pares parietaes (ás vezes fundidos), negras, tarjadas de branco (Fig. 16) .... *B. neuwiedii* WAGLER, 1824.

Nomes vulgares: Jararaca ou Jararaca-de-rabo-branco (S. Paulo até o extremo sul), Bocca-de-sapo (Matto Grosso), Rabo-de-osso (Goyaz) e Tira-peia (nordeste).

Nota: Segundo mostrei recentemente (*in* Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. **2**:56-62, tabs. XIII-XVI. 1925; Mem. Inst. Butantan **4**: 114-115 *et* 237-239. 1930 *et* **10**: 158-160. 1936), a especie *B. neuwiedii* é sub-divisivel em raças geographicas, distribuidas pelos differentes districtos do Brasil, com excepção apenas do valle amazonico, onde a especie ainda não foi assignalada.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em outubro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

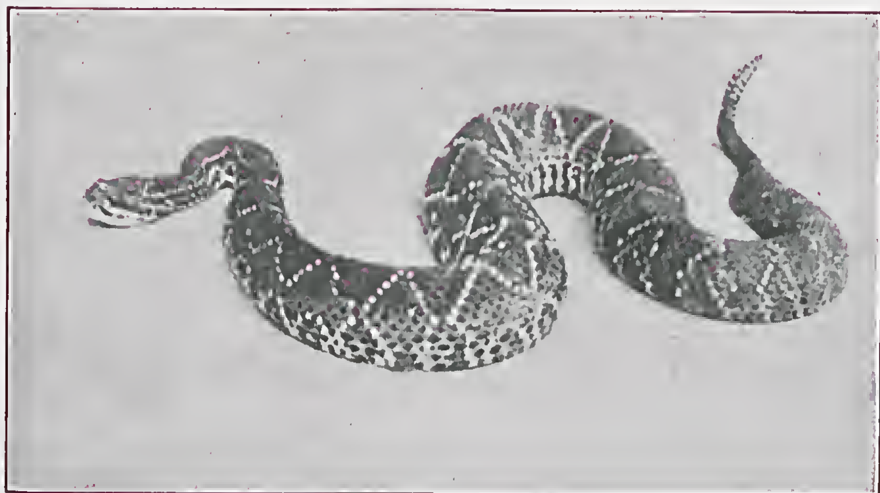
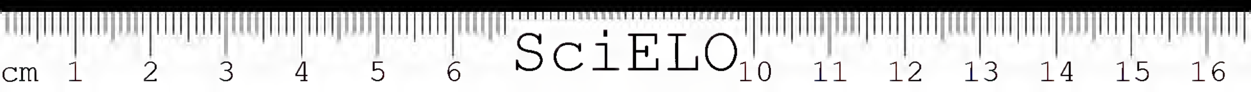


Fig. 1
Crotalus terrificus



Fig. 2
Lachesis muta


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

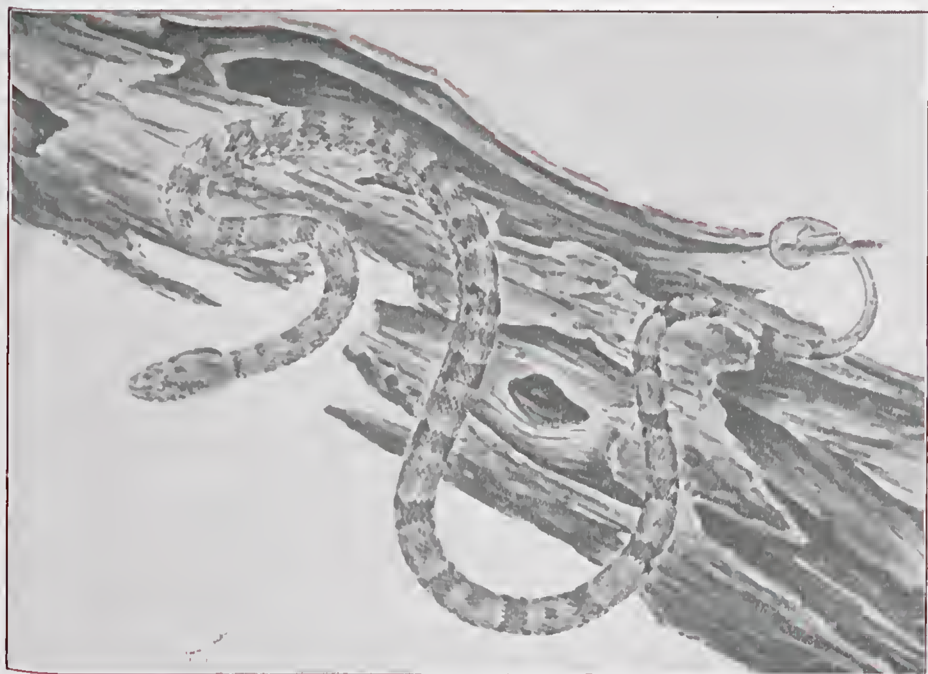


Fig. 3
Bothrops castelnaudi

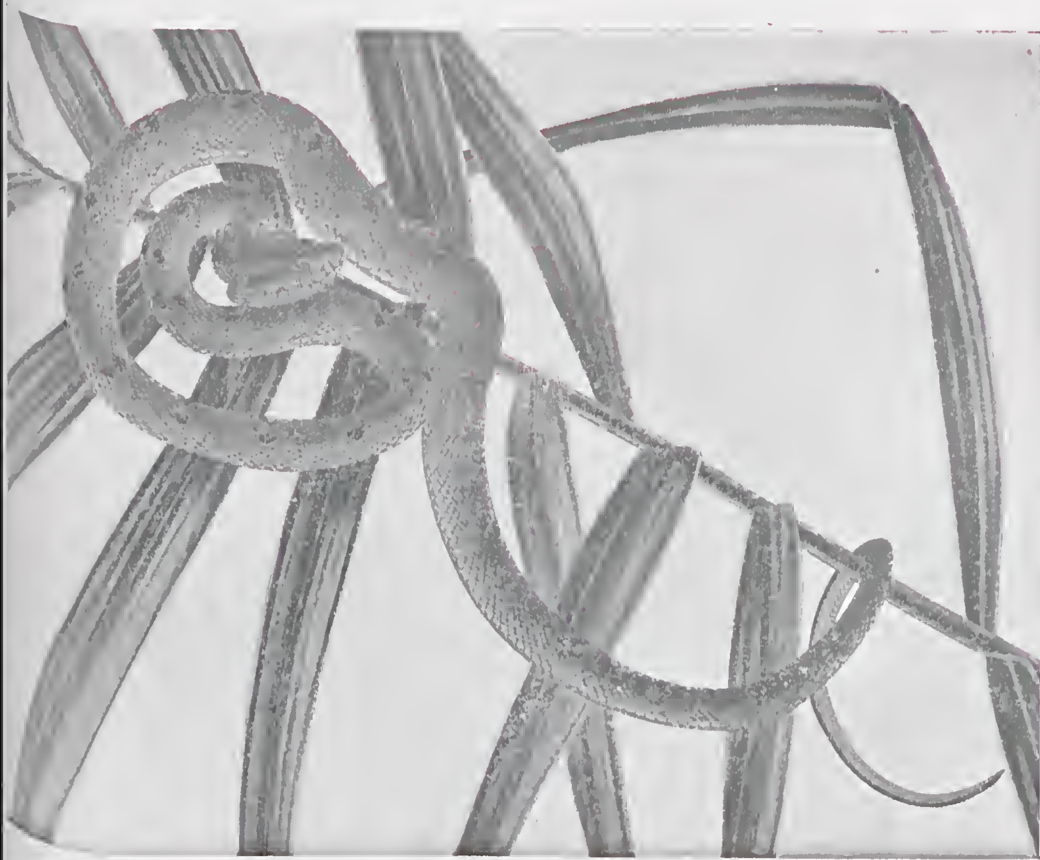
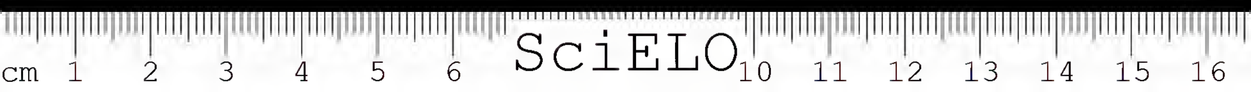


Fig. 4
Bothrops bilineata


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937



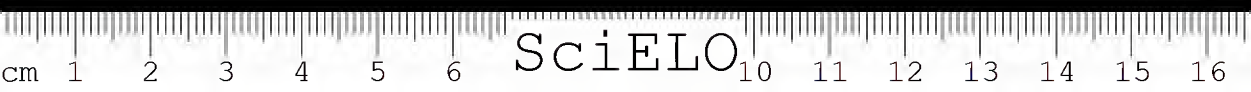
Fig. 5

Bothrops insularis



Fig. 6

Bothrops atrox


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

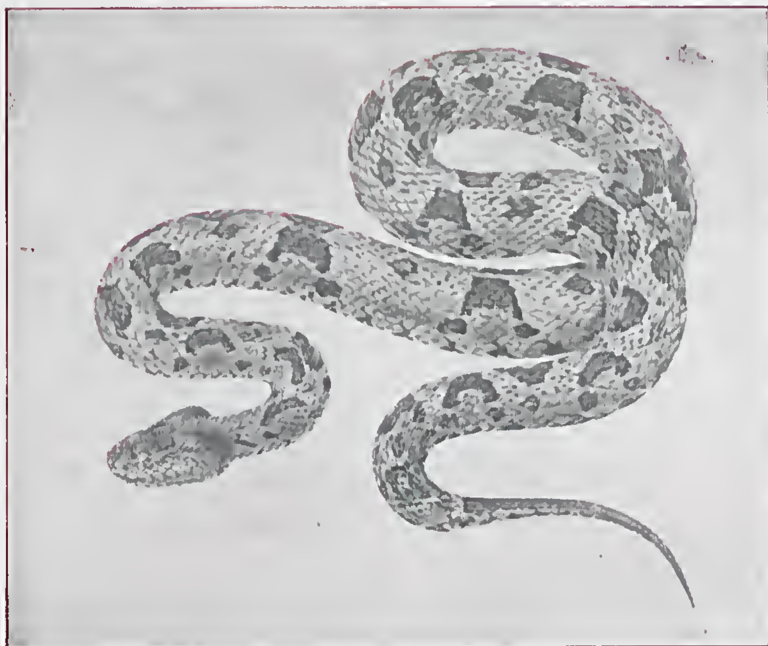
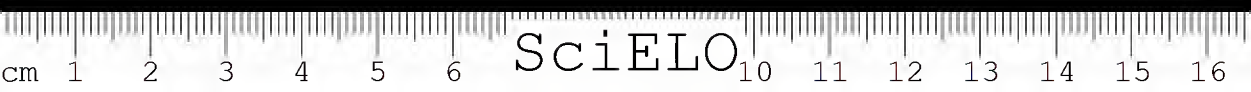


Fig. 7
Bothrops neglecta



Fig. 8
Bothrops jararaca


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937



Fig. 9
Bothrops jararacussu

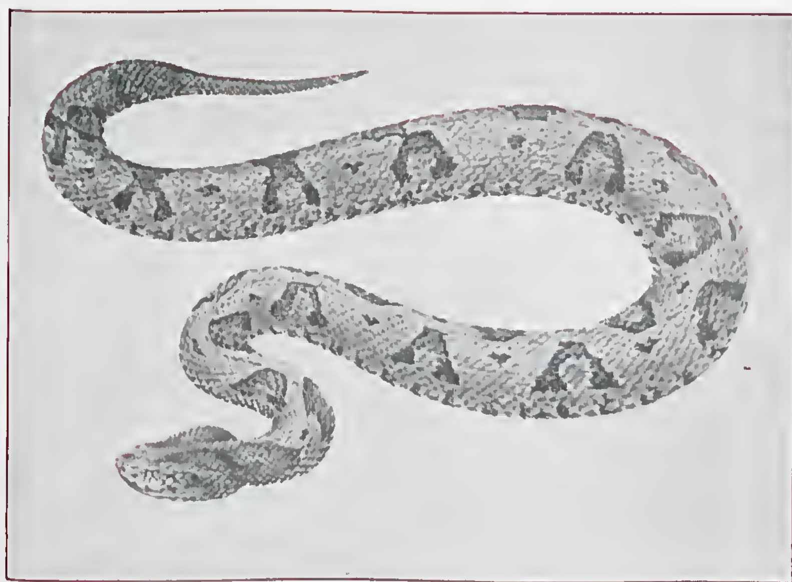
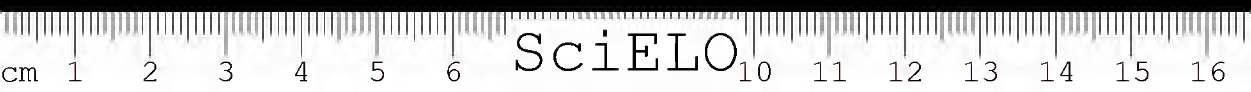


Fig. 10
Bothrops pirajai


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937

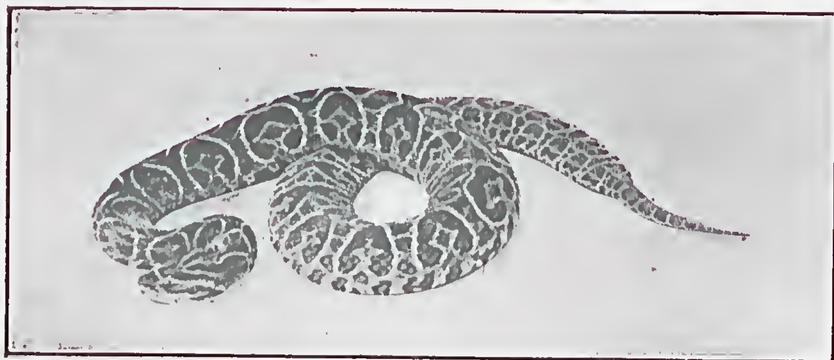


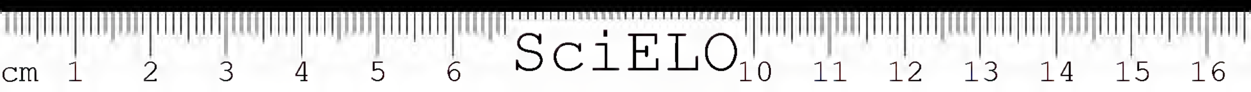
Fig. 11

Bothrops alternata



Fig. 12

Bothrops cotiara


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937

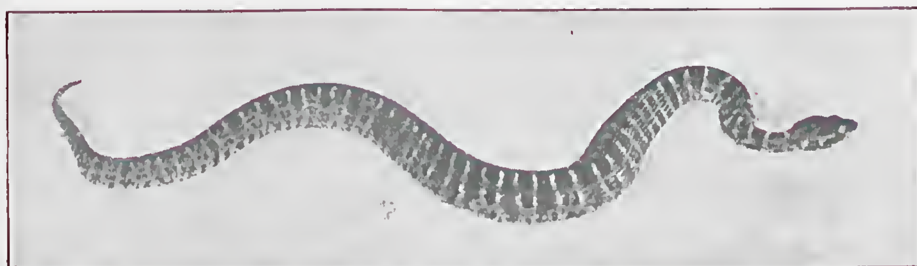
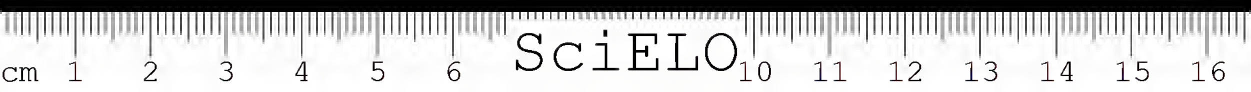


Fig. 13
Bothrops itapetiningae



Fig. 14
Bothrops erythromelas


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937

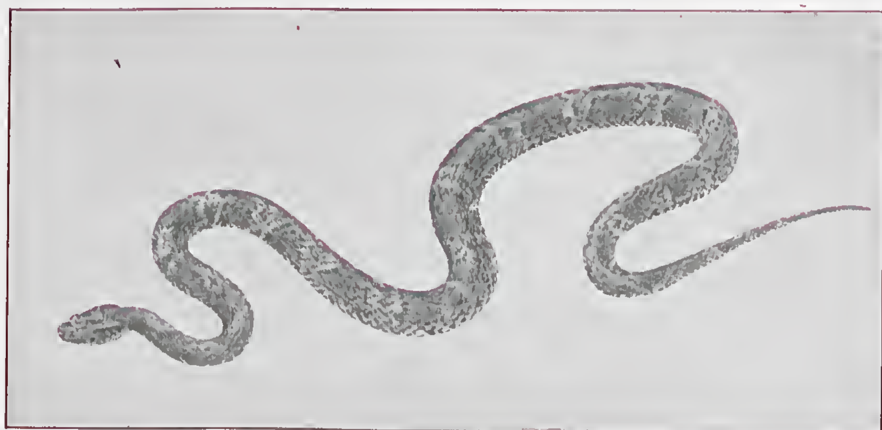
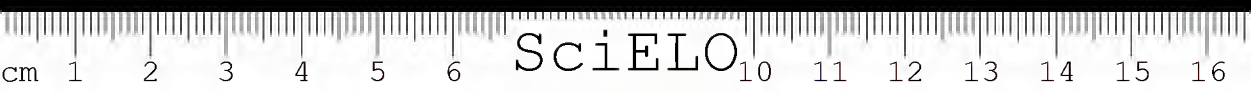


Fig. 15
Bothrops iglesiasi



Fig. 16
Bothrops neuwiedii


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

ESTUDOS SOBRE OPHIDIOS NEOTROPICOS

34. Novas notas sobre a fauna da Colombia e descripção de uma especie nova de Colubrideo aglypho.

POR

AFRANIO do AMARAL

De meus distinctos correspondentes na Colombia, Revº. Niceforo Maria, do Instituto de La Salle, Bogotá, e Revº. Daniel, do Collegio Departamental de San José, Antioquia, recebi ha algum tempo varios novos exemplares de repteis para effeito de identificação. Desses exemplares, um representa especie nova para a sciencia e dois correspondem a formas ainda não registradas na Colombia.

As localidades em que foi colligido este material são as seguintes: Barranquilla (Atlantico); Bello (Antioquia); Carare (Santander); Cúcuta (fronteira da Venezuela); Girardot (Rio Magdalena); Ibagué (Tolima); La Ceja (Antioquia); La Estrella (Antioquia); Medellin (Antioquia); Muzo (norte de Bogotá); Pueblo Rico (Chocó); Sasaima (noroeste de Bogotá); San Pedro (Antioquia); Rio Negro (Antioquia); Sibaté (sul de Bogotá); Sonsón (sul de Medellin, Antioquia); Titiribi (rio Cauca, oeste de Medellin, Antioquia); Villavicencio (Meta, leste de Bogotá).

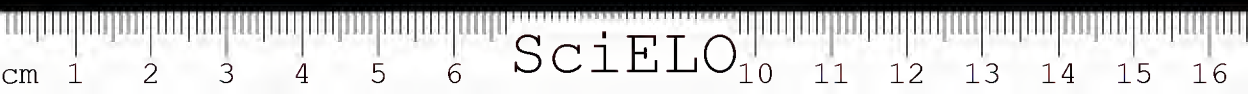
Esse lote, composto de 23 exemplares, corresponde a 19 formas differentes, a saber:

Fam. TYPHLOPIDAE

Helminthophis canellei Mocquard, 1903

H. canellei: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:8, 135.1929 (1930).

Esta especie, cujo typo procede do Panamá e que não havia ainda sido registada na Colombia, caracteriza-se pela presença de 4 supralabiaes, 2 preo-



culares e de rostral larga, podendo das demais especies occorrentes naquelle país, e por mim registadas (1), facilmente distinguir-se pelos caracteres assignalados em um dos meus trabalhos anteriores (2).

No. 149 (I. L. S.), procedente de Villavicencio. Exemplar adulto, typico.

Dimensões: Comprimento total 195 mm.; cauda 20 mm..

Leptotyphlops macrolepis (PETERS, 1857)

L. macrolepis: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:139.1929 (1930);**7**:107.1932 *et* **9**:209.1935; Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):90.1931.

Esta especie, já assignalada na Colombia, é representada por um exemplar jovem: No. 150 (I. L. S.), procedente de Ibagué.

Dimensões: Comprimento total 90 mm.; cauda 10 mm..

Registado originalmente na Venezuela, este ophidio subterraneo parece commum na Colombia e no Brasil. Examinando comparativamente exemplares jovens e adultos, procedentes da Colombia e do Brasil (Estados de Matto Grosso e Espirito Santo) não pude descobrir nelles quaesquer fundamentaes differenças morphologicas, apesar da enorme distancia geographica que os separava. Apenas a rostral surge ás vezes mais curta, o que, todavia, me parece ser antes devido ao factor idade ou á maneira de preservação do material.

Fam. COLUBRIDAE

Helicops danieli, sp. n.

Corpo algo curto; cabeça pequena; olhos dirigidos para cima e para o lado; narinas dirigidas para cima. Rostral mais larga do que alta, visivel de cima; internasal unica; prefrontaes mais largas do que longas; frontal mais larga posterior do que anteriormente, mais longa do que sua distancia da extremidade do focinho e um pouco mais curta do que as parietaes; nasal semi-dividida; frenal um pouco mais alta do que longa; preocular 1, alta, mas bem afastada da frontal; postoculares 2; temporaes 2 + 2; supralabiaes 8/9 (apenas a 4a. contigua á orbita); 5 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores que são longas quanto as posteriores. Escamas dorsaes em 19 filas, todas fortemente carinadas desde a nuca até a cauda, menos a serie paraventral, que é lisa. Ventraes 143; anal 2; subcaudaes 62 p..

Colorido: Dorso pardo-roseo com 4 series alternadas de manchas negras; cabeça negra; labios claros manchados de negro anteriormente; nuca com 1 curta mancha branca transversal de cada lado; garganta branca com algumas pintas negras e 1 estria negra, de cada lado, entre as mentaes e as infralabiaes;

ventre branco com 2 series longitudinaes de crescentes negros, dispostos de sorte a formarem 2 faixas escuras separadas por 3 faixas claras, as 2 externas extendidas até o meio da 2.ª serie de escamas dorsaes.

Holotypo: Exemplar immaturo ♀, No. 9872, na collecção do Instituto Butantan. Correspondente ao exemplar No. 35, colhido em Carare (Santander) e remettido pelo Revº. Hermano Daniel, a quem a especie é dedicada, como homenagem ao seu labor em pról do conhecimento da fauna herpetologica da Colombia.

Dimensões: Comprimento total 235 mm.; cauda 55 mm..

Nota: Na collecção do Instituto de La Salle existe um exemplar, No. 99, que havia sido por mim anteriormente classificada como *H. leopardina*, segundo se acha registado *in* Mem. Inst. Butantan **7**:109.1932. A' luz do estudo agora feito, passo a identificar esse especime com a nova especie.

H. danieli é affim a *H. angulata* (L.) e *H. scalaris* Jan, das quaes se distingue pelo maior numero de ventraes e pelo colorido.

Eudryas boddaertii (SENTZEN, 1796)

Drymobius boddaertii: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:154.1929(1930); Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):91.1931.

Eudryas boddaertii: Amaral — Mem. Inst. Butantan *7*:110.1932.

Representada na collecção por 2 exemplares:

No. 32 (C. D.), procedente de Bello. Adulto ♀, com a seguinte pholidose: Spl. 9/9; D. 17; V. 182; A. 2; Sbc. 63 p. + n..

Dimensões: Comprimento total 935 mm.; cauda 200 mm..

No. 33 (C. D.), procedente de Medellin. Semi-adulto ♂, com a seguinte pholidose: Spl. 9/9; D. 17; V. 176; A. 2; Sbc. 101 p..

Dimensões: Comprimento total 953 mm.; cauda 200 mm..

O colorido do No. 32 é o seguinte: cinza-azulado no dorso até o lado das ventraes, com uma faixa clara longitudinal em cada lado da parte anterior do corpo; faixa ocular pouco nitida; centro do ventre cinza claro immaculado. O colorido do No. 33 é o seguinte: cinza-claro (ou pardo acinzentado onde foi conservada a camada cornea) no dorso até o lado do ventre, com 4 faixas claras longitudinaes, sendo 2 de cada lado: a 1a. entre a serie 1 e a serie 2 de escamas e a 2.ª entre a serie 4 e a serie 5 de escamas, faixas estas ligadas transversalmente por estrias escuras desde a nuca até o meio do corpo; faixa trans-ocular bem nitida; labios claros, tarjados de escuro; garganta clara, bem manchada e marmorada de pardo; ventre claro no centro, com pintas pardas lateraes.



Stuart (3), tratando dos exemplares occorrentes na Colombia, distribuiu-os pelas seguintes formas: *E. b. boddaertii* (Sentzen), no Sul e no Centro; *E. quinquelineatus* (Steindachner), no Leste e no Norte; *E. ruthveni* Stuart, na Sierra Nevada. Si estivesse correcta a relação entre essa differenciação e a distribuição geographica, assignaladas no referido trabalho, os 2 exemplares ora por mim examinados deveriam chorologicamente corresponder á forma typica, o que não acontece, pois o de No. 33 corresponde á forma *pleii* de Duméril e Bibron. Tenho, aliás, a impressão de que Stuart, para reconhecer aquellas formas, foi levado a subdividir excessivamente a especie *boddaertii*, dando valor exaggerado a caracteres chromaticos, pois as differenças morphologicas que assignalou, não são nitidas, nem convenientes. Assim é que, ao distinguir *E. ruthveni* de *E. quinquelineatus* e de *E. boddaertii*, se baseou no "maior numero de subcaudaes". Ora, o numero que registou destas placas varia de 114 a 121; no entanto, Boulenger (4) já havia assignalado em exemplares da forma typica, oriundos da Venezuela e das Guianas, o limite de 113 a 115 subcaudaes.

Dendrophidion bivittatum (Dm. & Bibr., 1854)

Drymobius bivittatus: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:154.1929(1930).

Dendrophidion bivittatum: Amaral — *loc. cit.* 9:210.1935.

No. 39 (C. D.), procedente de Medellin. Adulto ♂: Spl. 9/9; D. 17; V. 148; A. 2; Sbc. 92 p..

Dimensões: Comprimento total 690 mm.; cauda 230 mm..

Colorido: Dorso acinzentado, com as 2 faixas paravertebraes nitidas e com uma linha negra longitudinal entre a 2a. e a 3a. series de escamas.

Phrynonax poecilonotus shropshirei (Barbour & Amaral, 1924)

P. p. shropshirei: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:317. Fig. 4,156.1929 (1930); Bull. Antivenin Inst. America 4(4):91.1931.

Esta raça é representada na collecção por um unico exemplar:

No. 155 (I. L. S.), procedente de Muzo. Aulto ♂, com a seguinte pholidose: Spl.? (labios mutilados); D. 24 (23); V. 203; Sbc. 115 p..

Dimensões: Comprimento total 1380 mm.; cauda 330 mm..

Colorido: Pardo alaranjado, com o dorso listado de amarello e as escamas pintadas de preto; ventre avermelhado, mudando para pardo até anegrado posteriormente.

Leimadophis epinephelus (COPE, 1862)

L. epinephelus: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:165.1929(1930) *et* 9:211.1935; Bull. Antivenin Inst. America 4(4):91.1931.

Representada na collecção por 2 exemplares:

No. 34 (C. D.), procedente de Titiribi. Adulto ♂: Spl. 8/8; D. 17; V. 147; A. 2; Sbc. 53 p.; 5/4 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores.

Dimensões: Comprimento total 470 mm.; cauda 115 mm..

Colorido: Ventre amarello-roseo com manchas negras.

No. 41 (C. D.), procedente de La Ceja. Adulto ♂: Spl. 8/9; D. 17; V. 153; A. 2; Sbc. 52 p.; 4/4 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores.

Dimensões: Comprimento total 450 mm.; cauda 95 mm..

Colorido: Ventre avermelhado com manchas pretas.

Lygophis taeniurus albiventris (JAN, 1863)

L. t. albiventris: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:21,170.1929(1930) *et* 9:211.1935; Bull. Antivenin Inst. America 4(4):91.1931.

No. 147 (I. L. S.), procedente de Villavicencio. Adulto ♀: Spl. 7/7; D. 17; V. 137; A. 2; Sbc. 67 p..

Dimensões: Comprimento total 420 mm.; cauda 110 mm..

Colorido: Azul olivaceo (sem a camada cornea), com a região vertebral mais escura e a paraventral mais clara, separadas posteriormente por uma linha negra, tarjada de claro, que se accentua ao longo da cauda; ventre claro levemente manchado de negro.

Exemplar anomalo, desprovido de frenal e com 1 só preocular, representando talvez um hybrido das 2 raças occorrentes na Colombia — *albiventris* e *bipraeocularis*.

Atractus crassicaudatus (DM. & BIBR., 1854)

A. crassicaudatus: Amaral — Mem. Inst. Butantan 4:186.1929(1930); Bull. Antivenin Inst. America 4(4):92.1931.

No. 146 (I. L. S.), procedente de Sibaté. Immaturo ♂: Spl. 6/6; D. 17; V. 152; A. 1; Sbc. 27 p..

Dimensões: Comprimento total 175 mm.; cauda 20 mm..

Colorido: Roseo-anegrado em cima, com mancha temporal creme-rosea.



Atractus lasallei Amaral, 1931

A. lasallei: Amaral — Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):87.1931; Mem. Inst. Butantan **7**:114.1932.

No. 38 (C. D.), procedente de Medellin. Adulto ♂; Spl. 7/6; D. 17; V. 165; A. 7; Sbc. 24 p.; postoculares 2/2; temporaes 1 + 2 (1 fundida com a parietal á direita); 4 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores e todas tuberculares.

Dimensões: Comprimento total 325 mm.; cauda 25 mm..

Colorido: Dorso e ventre anegrados, com os flancos estriados de branco.

Atractus loveridgei Amaral, 1930

A. loveridgei: Amaral — Bull. Antivenin Inst. America **4**(2):28.1930; Mem. Inst. Butantan **4**:187.1929(1930); **7**:114.1932 *et* **9**:213.1935.

No. 40 (C. D.), procedente de San Pedro, Adulto ♀: Spl. 7/7; D. 17; V. 169; A. 1; Sbc. 14 p..

Dimensões: Comprimento total 455 mm.; cauda 30 mm..

Colorido: Dorso pardacento, com 3 linhas longitudinaes negras de cada lado; ventre roseo, com manchas negras, sobretudo nos lados.

Atractus obtusirostris Werner, 1924

A. obtusirostris: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:188.1929(1930) *et* **7**:116.1932; Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):92.1931.

No. 153 (I. L. S.), procedente de Sasaima. Jovem ♂: Spl. 8/7; D. 17; V. 160; A. 1; Sbc. 42 p..

Dimensões: Comprimento total 135 mm.; cauda 20 mm..

Colorido: Pardo em cima, mais claro no flanco, com indicio de estria lateral; ventre claro, com manchas pardas medianas; cabeça escura com mancha clara temporo-labial.

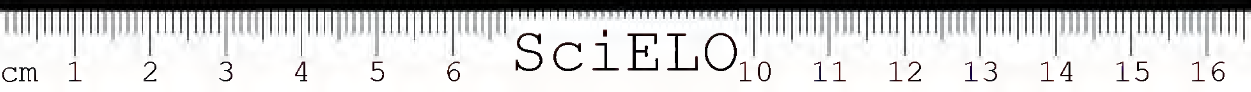
Atractus punctiventris Amaral, 1932

A. punctiventris: Amaral — Mem. Inst. Butantan **7**:117.1932.

No. 151 (I. L. S.), procedente de Sonsón. Adulto ♂: Spl. 7/7; D. 15; V. 157; A. 1; Sbc. 28 p.; infralabiaes e gulares com tuberculos.

Dimensões: Comprimento total 430 mm.; cauda 55 mm..

Colorido: Dorso pardo chocolate, com manchas claras longitudinaes, no intervallo de manchas escuras; ventre anegrado, com pintas claras, sobretudo nos lados.



Pseudoboa cloelia (DAUDIN, 1803)

P. cloelia: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:205.1929(1930) *et* **7**:120. 1932; Bull. Antivenin Inst. America **7**(4):93.1931.

No. 37 (C. D.), procedente de Rio Negro. Adulto ♀: Spl. 7/7; D. 17; V. 215; A. 1; Sbc. 63 p..

Dimensões: Comprimento total 725 mm.; cauda 125 mm..

Colorido: Plumbeo no dorso até o lado das ventraes e das subcaudaes; ventre claro ao longo do centro.

Tantilla semicincta (DM. & BIBR., 1854)

T. semicincta: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:222.1929(1930). Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):93.1931.

Representada na collecção por 3 exemplares:

No. 144 (I. L. S.), procedente de Barranquilla. Adulto ♂: Spl. 7/7; D. 15; V. 169; A. 2; Sbc. 63 p.; postoculares 2/2.

Dimensões: Comprimento total 515 mm.; cauda 125 mm..

Colorido: Dorso negro, com 16/18 manchas brancas de cada lado até o ventre e com 1 faixa transversa branca na nuca, 3 sobre o dorso, 1 ao nivel do anus e 3 sobre a cauda; faixa branca nuchal interrompida no centro; focinho branco, rostral manchada de negro inferiormente.

No. 148 (I. L. S.), procedente de Cúcuta. Adulto ♂: Spl. 7/7; D. 15; V. 166; A. 2; Sbc. 67 p..

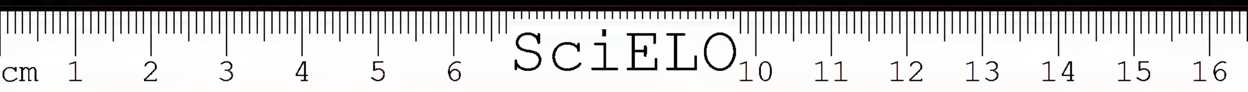
Dimensões: Comprimento total 255 mm.; cauda 60 mm..

Colorido: Dorso branco, com 2 faixas negras longitudinaes até a altura do anus; cabeça escura; focinho mais claro, rostral escura inferiormente; labiaes escuras, com mancha clara preocular nitida e postocular apagada; manchas brancas, bem nitidas.

No. 154 (I. L. S.), procedente de Cúcuta. Adulto ♀: Spl. 7/7; D. 15; V. 169; A. 2; Sbc. 49 p. + n.; frontal longa; postoculares 1/1.

Dimensões: Comprimento total 245 mm. + n.; cauda 15 mm. + n..

Colorido: Dorso branco, com 1 serie de manchas negras redondo-alongadas, de cada lado, quasi fundidas entre si, de sorte a simularem 1 faixa longitudinal, separada da do lado opposto pela côr branca do fundo sob a forma de faixa e interrompida no 1/6 anterior onde se fundem as manchas negras lateraes; dorso da cauda negro, com manchas transversaes brancas; cabeça escura, mais clara no focinho e entre a frontal e a supraocular; rostral escura inferiormente; nuca



com 1 faixa clara de cada lado, quasi ligada á opposta; labios escuros, com uma mancha clara preocular e outra postocular.

Esta enorme variação do colorido em exemplares de uma mesma especie e procedentes de identica região, mostra a que influencias teriam ficado sujeitos, no decorrer de sua evolução, ophidios de habitos subterraneos como os do genero *Tantilla*.

Fam. ELAPIDAE

Micrurus annelatus (PETERS, 1871)

M. annelatus: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:228.1929(1930): Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):94.1931.

No. 152 (I. L. S.), procedente de Girardot. Adulto ♂: Spl. 7/7; D. 15: V. 199; A. 2; Sbc. 50 p.; 4 infralabiaes contiguas ás mentaes anteriores.

Dimensões: Comprimento total 620 mm.; cauda 105 mm..

Colorido: Dorso negro, com 39 aneis brancos equidistantes anteriormente até perto da cauda, onde se approximam de 2 a 2; cabeça negra, com anel branco cruzando por trás dos parietaes.

Micrurus mipartitus (DM. & BIBR., 1854)

M. mipartitus: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:231.1929(1930) *et* **7**:122 1932; Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):94.1931.

No. 42 (C. D.), procedente de La Estrella. Immaturo ♀: Spl. 6/4 (3a. 4a e 5a. fundidas á esquerda); D. 15; V. 300: A. 2; Sbc. 26 p..

Dimensões: Comprimento total 260 mm.; cauda 10 mm..

Colorido: Dorso negro, com 47 aneis brancos sobre o corpo e 2 sobre a cauda.

Micrurus spixii WAGLER, 1824

M. spixii: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:232.1929(1930).

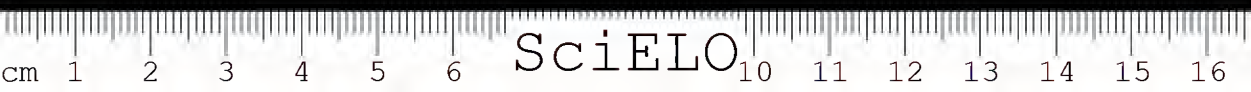
Esta especie, que não havia ainda sido registada na Colombia, é representada na collecção por um exemplar:

No. 145 (I. L. S.), procedente de Cúcuta. Jovem ♀: Spl. 6/7; D. 15; V. 200; A. 2; Sbc. 24 p.; temporaes 2 + 2.

Dimensões: Comprimento total 210 mm.; cauda 15 mm..

Colorido: Dorso branco-roseo, com 10 triadas de aneis pretos sobre o corpo e 1 sobre a cauda, cuja ponta é preta; focinho negro até a altura da região ocular.

8



Fam. CROTALIDAE

Bothrops atrox (L., 1758)

B. atrox: Amaral — Mem. Inst. Butantan **4**:234.1929(1930); **7**:123.1932 *et* 9:216.1935; Bull. Antivenin Inst. America **4**(4):94.1931.

No. 156 (I. L. S), procedente de Pueblo Rico. Adulto ♂ : Spl. 8/8; D. 25; V. 171; Sbc. 53 p.; carina das escamas dorsaes bem alta e curta, conforme assignalei anteriormente (5).

Dimensões: Comprimento total 1420 mm.; cauda 170 mm..

Colorido: Roseo pardo, com manchas escuras tarjadas de claro em forma de ∧ de cada lado, ás vezes fundidas com as oppostas de sorte a constituirem X transversaes, donde o nome vulgar de "Echis", que recebe a especie na Colombia.

RECTIFICAÇÃO

Devido á minha ausencia na Europa, não pude acompanhar a revisão das provas dos "Estudos sobre Ophidios Neotropicos" XXXII e XXXIII, que, em 1935, publiquei no vol. IX destas Memorias. No texto desses trabalhos appareceram algumas transposições de linha cuja rectificação aproveito a opportunidade para fazer:

1a., á pagina 213, a 4a. linha do texto relativo a *Atractus latifrons* (Günther) deve passar para a 3.ª linha do texto relativo a *Atractus niceforoi* Amaral. Essa linha está assim redigida: "na collecção do Instituto Butantan: Spl. 7; D. 15; V. 146; A. 1; Sbc. 22p.";

2a., a indicação bibliographica de *Atractus loveridgei* Amaral deve ser permutada com a relativa a *Atractus niceforoi* Amaral.

3a., a pagina de gravuras das "Novas Especies de Ophidios da Colombia" apresenta como Fig. 5 o desenho dorsal de *Leptocalamus limitaneus*, o qual deve ficar como Fig. 2; de seu lado, a Fig. 2 representa o desenho em semi-perfil de *Apostolepis niceforoi*, o qual deve ficar como Fig. 5.

ABSTRACT

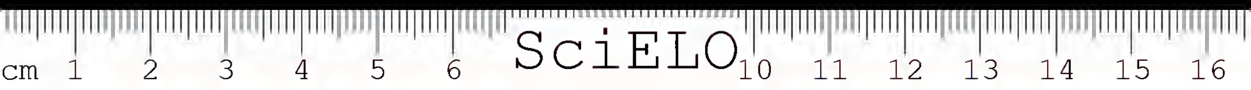
In a lot of serpents lately received from Colombia representatives of two species were found which have never been registered in that country, namely: *Helminthophis canellei* Mocquard, 1903 and *Micrurus spixii* Wagler, 1824.

A new species of aglyphous Colubridae was also found and described. This is *Helicops danieli*, sp. n., holotype No. 9872 in the Instituto Butantan collection, secured at Carare (Santander, Colombia).

BIBLIOGRAPHIA

1. *Amaral, A. do* — Bull. Antivenin Inst. America 4(4):90.1931.
2. *Amaral, A. do* — Mem. Inst. Butantan, 4:7-8.1920(1930).
3. *Stuart, L. C.* — O. P. Mus. Zool. Univ. Michigan (254):2.1933
4. *Boulenger, G. A.* — Cat. Sn. Brit. Museum, 2:13.1894.
5. *Amaral, A. do* — Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med. 2:32.1925.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).



590.1

REGRAS INTERNACIONAES DE NOMENCLATURA ZOOLOGICA

TRADUCÇÃO PARA O PORTUGUÊS

2.ª EDIÇÃO

POR

AFRANIO DO AMARAL

PREFACIO DA 2.ª EDIÇÃO

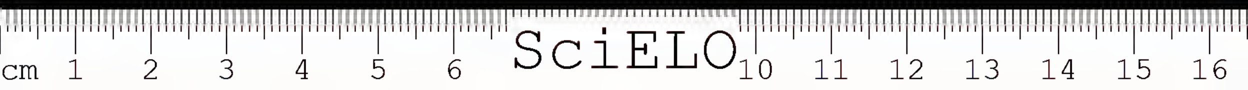
A procura que teve a 1.ª edição da traducção portuguesa, por mim publicada *in* Memorias do Instituto Butantan **5**:235-264.1930, das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, veiu mostrar a falta que uma iniciativa dessa ordem estava a fazer aos circulos biologicos do Brasil e de Portugal.

Anima-me a publicar esta 2.ª edição a circunstancia de haverem sido emittidas, por parte da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica, 19 novas opiniões que tomaram os Nos. 115 a 133, sobre questões que, de 1931 em diante, foram por ella esclarecidas e cuja divulgação em nosso idioma se tornou imperiosa.

São Paulo, dezembro de 1937.

JUSTIFICAÇÃO DA 1.ª EDIÇÃO

Ha muitos annos se vem fazendo sentir nos meios scientificos do Brasil e de Portugal a necessidade duma edição portuguesa das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica, obrigados como se vêem os technicos dos dois países ao manuseio constante de edições em linguas estrangeiras, com cujas particularidades nem sempre têm elles a ventura de estar familiarizados. A crescente contribuição, oriunda de Portugal e especialmente do Brasil, ao progresso da



zoologia em geral e da zoologia medica em particular, justifica por sem duvida o esforço que resolvi fazer ao traduzir aquellas Regras para a nossa lingua.

Na verdade, deste assumpto já me venho occupando ha alguns annos. Assim é que, em 1925 e 1926, publiquei, na Revista do Museu Paulista, varias notas sobre Questões de Nomenclatura Ophiologica, para justificar a passagem, para a synonymia, de algumas especies de ophidios consideradas até então como validas. Tambem em 1925 o Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine reuniu no volume II de suas "Contributions" uma serie de artigos meus, em alguns dos quaes tratava eu de repôr em seus devidos termos outras questões attinentes á nomenclatura de ophidios neotropicos.

Ao ter conhecimento desses trabalhos que estavam a revelar um provavel interesse por este assumpto em nosso meio, o secretario da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica e membro do Instituto Nacional de Saude de Washington, Prof. Charles W. Stiles, me convidou, em fins de 1927, a traduzir para o português o importante Codigo, que tão precioso auxilio tem prestado a quantos trabalham em systematica zoologica.

Parece-me desnecessario encarecer a necessidade da introducção de um Codigo dessa natureza em nossa lingua, porquanto ao nosso meio é perfeitamente applicavel a opinião, expressa por aquella Commissão, de que se pode com segurança asseverar que relativamente poucos zoologos, ao começarem a sua carreira profissional, fazem uma idéa, perfunctoria que seja, das questões de nomenclatura, devido especialmente a que não se exige ainda, em nossos Collegios ou Faculdades, qualquer conhecimento de grammatica zoologica por parte daquelles que se candidatam a um diploma scientifico. Por isso mesmo, é de esperar que a presente edição receba benevolo acolhimento da parte dos zoologos brasileiros e portuguezes, cujas suggestões serão tomadas no devido apreço para a progressiva melhora do trabalho em futuras tiragens.

São Paulo, setembro de 1930



REGRAS E RECOMMENDAÇÕES

CONSIDERAÇÕES GERAES

ARTIGO 1 - A nomenclatura zoologica é independente da nomenclatura botanica no sentido de que o nome de um animal não se rejeita simplesmente por ser identico ao nome de uma planta. Si, todavia, um organismo é transferido do reino vegetal para o animal, seus nomes botanicos devem ser acceitos em nomenclatura zoologica com seu valor botanico original; e si um organismo é transferido do reino animal para o vegetal, seus nomes retêm o valor zoologico.

Recommendação — Faz-se bem em evitar a introducção em zoologia de nomes genericos já em uso em botanica.

ARTIGO 2 - A designação scientifica de animaes é uninominal para subgeneros e todos os grupos mais altos, binominal para especies e trinominal para subespecies.

Vide Opiniões Nos. 19, 20, 24, 35, 43, 46, 50, 54.

ARTIGO 3 - Como nomes scientificos de animaes se devem usar palavras que sejam latinas ou latinizadas, ou então consideradas e tratadas como taes, no caso de não serem de origem classica.

NOMES DE FAMILIAS E SUBFAMILIAS

ARTIGO 4 - O nome de uma familia se forma pela addição da terminação *idae* e o de uma subfamilia, pela addição de *inae*, á raiz do nome de seu genero typo.

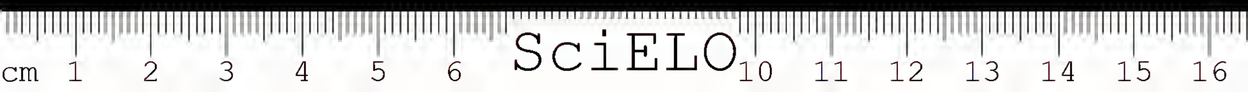
ARTIGO 5 - O nome de uma familia ou subfamilia deve ser mudado quando se troca o nome de seu genero typo.

NOMES GENERICOS E SUBGENERICOS

ARTIGO 6 - Os nomes genericos e subgenericos estão sujeitos ás mesmas regras e recommendações e, do ponto de vista da nomenclatura, são coordenados, isto é, possuem o mesmo valor.

Vide Opinião No. 72.

3



Artigo 7 - Um nome generico torna-se subgenerico, quando o genero correspondente passa a subgenero, e *vice-versa*.

Artigo 8 - Um nome generico deve consistir de uma só palavra, simples ou composta, escripta com letra maiuscula inicial e empregada como substantivo no nominativo singular. Exemplos: *Canis, Perca, Ceratodus, Hymenolepis.*

Recommendação — Certos grupos biologicos, propostos distinctamente como grupos collectivos e não como unidades systematicas, podem ser tratados por conveniencia como si fossem generos, mas sem requererem especie typo. Exemplos: *Agamodistomum, Amphistomulum. Agamofilaria, Agamomermis, Sparganum.*

Vide Opinião No. 44.

Recommendações — As seguintes palavras podem ser usadas como nomes genericos:

a) Substantivos gregos, com os quaes se devem seguir as regras de transcripção latina [transliteração (vide Appendice F)]. Exemplos: *Ancylus, Amphibola, Aplysia, Pompholyx, Physa, Cylichna.*

b) Vocabulos gregos compostos, nos quaes o attributivo deve preceder a palavra principal. Exemplos: *Stenogyra, Pleurobranchus, Tylodina, Cyclestomum, Sarcocystis, Pelodytes, Hydrophilus, Rhizobius.*

Isto, todavia, não exclue vocabulos formados á maneira de *Hippopotamus*, isto é, vocabulos em que o attributivo segue a palavra principal. Exemplos: *Philydrus, Biorhiza.*

c) Substantivos latinos. Exemplos: *Ancilla, Auricula, Dolium, Harpa, Oliva.* Adjectivos (*Prasina*) e participios passados (*Productus*) não são recommendados.

d) Vocabulos latinos compostos. Exemplos: *Stiliger, Dolabrifer, Semifusus.*

e) Derivados gregos ou latinos que exprimam diminuição, comparação, semelhança, ou posse. Exemplos: *Dolium, Doliolum; Strongylus, Eustrongylus; Limax, Limacella, Limacia, Limacina, Limacites, Limacula; Lingula, Lingulella, Lingulepis, Lingulina, Lingulops, Lingulopsis; Neomenia, Proneomenia; Buteo, Archibuteo; Gordius, Paragordius, Polygordius.*

f) Nomes mythologicos ou heroicos. Exemplos: *Osiris, Venus, Brisinga, Velleda, Crimora.* Si não forem latinos, taes nomes devem receber uma terminação latina (*Aegirus, Göndulia*).

g) Nomes proprios usados pelos antigos. Exemplos: *Cleopatra, Belisarius, Melania.*

h) Patronymicos modernos, aos quaes se junta uma terminação que denote dedicatoria:

α. Nomes que acabam por uma consoante, recebem a termnação *ius, ia,* ou *ium.* Exemplos: *Selysius, Lamarckia, Köllikeria, Mülleria, Stålia, Krøyeria, Ibañezia.*

β. Nomes que acabam pelas vogaes *e, i, o, u,* ou *y,* recebem a terminação *us, a* ou *um.* Exemplos: *Blainvillea, Wyvillea, Cavolinia, Fatioa, Bernaya, Quoya, Schulzea.*

γ. Nomes que acabam por *a,* recebem a terminação *ia.* Exemplo: *Danaia.*

δ. Em nomes genericos formados de patronymicos, omittem-se as particulas que não estejam ligadas com o nome, mas retêm-se os artigos. Exemplos: *Blainvillea, Benedenia, Chiajea, Lacepedea, Dumerilia.*

ε. Com patronymicos que consistam de dois vocabulos, apenas um destes se usa na formação de um nome generico. Exemplos: *Selysius, Targionia, Edwardsia, Duthiersia.*

ζ. O uso de substantivos proprios na formação de nomes genericos compostos é objectavel. Exemplos: *Eugrimmia, Buchiceras, Heromorpha, Möbiusispongia.*

i) Nomes de navios que se devem considerar como mythologicos (*Vega*) ou como patronymicos modernos. Exemplos: *Blakea, Hirondellea, Challengeria.*

j) Nomes barbaros, isto é, de origem não classica. Exemplos: *Vanikoro, Chilosa.* Taes palavras podem receber uma terminação latina. Exemplos: *Yetus, Fossarus.*

k) Palavras formadas por combinação arbitraria de letras. Exemplos: *Neda, Clanculus, Salifa, Torix.*

l) Nomes formados por anagramma. Exemplos: *Dacelo, Verlusia, Linospa.*

ARTIGO 9 - Si um genero é dividido em subgeneros, o nome do subgenero typico deve ser o mesmo que o do genero (vide Art. 25).

ARTIGO 10 - Quando se desejar citar o nome de um subgenero, colloca-se esse nome entre parentheses depois do generico e antes do especifico. Exemplos: *Vanessa* (*Pyrameis*) *cardui.*

NOMES ESPECIFICOS E SUBESPECIFICOS

ARTIGO 11 - Os nomes especificos e subespecificos estão sujeitos ás mesmas regras e recommendações e, do ponto de vista da nomenclatura, são coordenados, isto é, possuem o mesmo valor.

ARTIGO 12 - Um nome especifico torna-se subespecifico, quando a especie correspondente passa a subespecie, e *vice versa.*

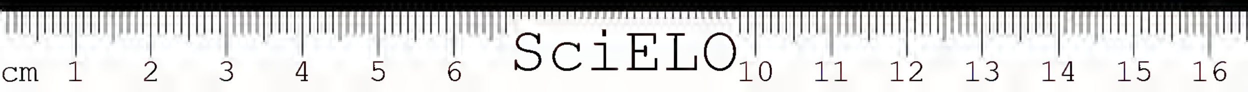
ARTIGO 13 - Embora substantivos especificos derivados de nomes de pessoas se possam escrever com letra maiuscula inicial, todos os demais nomes especificos devem ser escriptos com minuscula inicial. Exemplos: *Rhizostoma Cuvieri* ou *Rh. Cuvieri, Francolinus Lucani* ou *F. lucani, Hypoderma Diana* ou *H. diana, Laophonte Mohammed* ou *L. mohammed, Œstrus ovis, Corvus corax.*

ARTIGO 14 - São nomes especificos:

a) Adjectivos que grammaticalmente devem concordar com o nome generico. Exemplo: *Felis marmorata.*

b) Substantivos no nominativo em apposição ao nome generico. Exemplo: *Felis leo.*

c) Substantivos no genitivo. Exemplos: *rosae, sturionis, antillarum, galliae, sancti-pauli, santae-helenae.*



Si o nome é escolhido como dedicatoria a uma ou mais pessoas, forma-se o genitivo de accordo com as regras de declinação latina, desde que o nome tenha sido empregado e declinado em latim. Exemplos: *Plinii, Aristotelis, Victoris, Antonii, Elisabethae, Petri* (nome dado).

Si o nome é um patronymico moderno, forma-se sempre o genitivo pela addição, ao nome exacto e completo, de *i* si a pessoa for homem, ou de *ae* si a pessoa for mulher, mesmo que o nome tenha uma forma latina; colloca-se no plural si a dedicatoria comprehende varias pessoas do mesmo nome. Exemplos: *Cuvieri, Möbiusi, Nuñezi, Merianae, Sarasinorum, Bosi* (não *Bovis*), *Salmoni* (não *Salmonis*).

Recommendação — O melhor nome especifico é um adjectivo latino, curto, euphonico e de facil pronuncia. Vocabulos gregos, latinizados ou barbaros podem, todavia, ser usados. Exemplos: *gymnocephalus, echinococcus, ziczac, aguti, hoactli, urubitinga.*

E' bom evitar-se a introducção dos nomes *typicus* e *typus* para designar especies ou subespecies novas, porquanto taes nomes são sempre capazes de produzir confusão futura.

Vide Opiniões Nos. 8, 50, 64.

Artigo 15 - O emprego de nomes proprios compostos que indiquem dedicatoria, ou de vocabulos compostos que indiquem comparação com um objecto simples não representa excepção ao Art. 2. Nestes casos, os dois vocabulos que compõem o nome especifico são escriptos como uma só palavra com ou sem hyphen. Exemplos: *Sanctae-Catharinae* ou *sanctaecatharinae, Jan-Mayeni* ou *janmayeni, cornu-pastoris* ou *cornupastoris, cor-anguinum* ou *coranguinum, cedo-nulli* ou *cedonulli.*

Expressões como *rudis planusque* não são admissiveis como nomes especificos.

Vide Opinião No. 50.

Artigo 16 - Nomes geographicos devem ser empregados como substantivos no genitivo, ou collocados em forma adjectiva. Exemplos: *sancti-pauli, sanctae-helenae, edwardiensis, diemenensis, magellanicus, burdigalensis, vindobonensis.*

Recommendação — Nomes geographicos usados pelos romanos ou escriptores latinos da idade media devem ser adoptados de preferencia a formas mais recentes. Palavras como *bordeausiacus* e *viennensis* são más; todavia, não devem ser rejeitadas por isso.

Artigo 17 - Si se deseja citar o nome subespecifico, deve-se escrever tal nome immediatamente após o especifico, sem a interposição de qualquer signal de pontuação. Exemplo: *Rana esculenta marmorata* Hallowell, mas não *Rana esculenta* (*marmorata*) ou *Rana marmorata* Hallowell.

Artigo 18 - A notação de hybridos pode-se fazer de varias maneiras; em todos os casos o nome do pai precede o da mãi, com ou sem os symbolos do sexo:

a) Os nomes dos dois pais são unidos pelo signal de multiplicação (×). Exemplo: *Capra hircus* ♂ × *Ovis aries* ♀ e *Capra hircus* × *Ovis aries* são formas igualmente boas.

b) Podem-se tambem citar hybridos sob forma de fracção, ficando o pai como numerador e a mãi como denominador. Exemplo. $\frac{\textit{Capra hircus}}{\textit{Ovis aries}}$. Este segundo methodo é preferivel, tanto mais quanto permitte a citação da pessoa que primeiro publicou a forma hybrida como tal. Exemplo: $\frac{\textit{Bernicla canadensis}}{\textit{Anser cygnoides}}$ Rabé.

c) A forma de fracção tambem é preferivel quando um dos pais é hybrido. Exemplo: $\frac{\textit{Tetrao tetrix} \times \textit{Tetrao urogallus}}{\textit{Gallus gallus}}$. Todavia, para o ultimo caso se podem usar parentheses. Exemplo: (*Tetrao tetrix* × *Tetrao urogallus*) × *Gallus gallus*.

d) Quando os pais do hybrido não são conhecidos como taes [pais], o hybrido recebe provisoriamente o nome especifico como si fosse uma verdadeira especie e não um hybrido; todavia, o nome generico é precedido pelo signal de multiplicação. Exemplo: × *Coregonus dolosus* Fatio.

FORMAÇÃO, DERIVAÇÃO E ORTHOGRAPHIA DE NOMES ZOOLOGICOS

Artigo 19 - A orthographia original de um nome deve ser conservada, a menos que deixe transparecer um erro de transcripção, um *lapsus calami* ou um erro typographico.

Vide Opiniões Nos. 8, 26, 27, 29, 34, 36, 41, 60, 61, 63, 70.

Recommendação — Na graphia de nomes scientificos é aconselhavel o uso de caracteres differentes dos empregados no texto. Exemplo: *Rana esculenta* [italicos] Linneu, 1758, vive na Europa.

Artigo 20 - Na formação de nomes derivados de linguas em que se usa o alphabeto latino, deve-se conservar exactamente a graphia original, inclusive signaes diacriticos. Exemplos: *Selysius, Lamarckia, Köllikeria, Mülleria, Stålia, Krøyeria, Ibañezia, Möbiusi, Medići, Cžjžki, spitzbergensis, islandicus, paraguayensis, patagonicus, barbadensis, färöensis.*

Recommendações — Os prefixos *sub* e *pseudo* devem ser usados somente com adjectivos e substantivos, *sub* com vocabulos latinos, *pseudo* com vocabulos gregos e não devem apparecer ligados a nomes proprios. Exemplos: *subviridis, subchelatus, Pseudacanthus, Pseudophis, Pseudomys.* Palavras como *sub-Wilsoni* e *pseudo-grateloupana* não são recommendadas.

As terminações *oides* e *ides* só devem ser empregadas em combinação com substantivos gregos ou latinos; não o devem em combinação com nomes proprios.

Nomes geographicos e patronymicos de países que não têm orthographia reconhecida ou que não usam o alphabeto latino, devem ser transcriptos para o latim de accordo com as regras adoptadas pela Sociedade Geographica de Paris (Vide Appendice, letra G).

Na creação de novas designações baseadas em nomes proprios e pessoas, escriptos algumas vezes com ä, ö ou ü, outras vezes com ae, oe e ue, recommenda-se que os auctores adoptem ae, oe e ue. Exemplo: *muelleri* de preferencia a *mülleri*.

NOME DE AUCTOR

Artigo 21 - O auctor de um nome scientifico é aquella pessoa que primeiro publica o nome ligado a uma indicação, definição, ou descripção, a menos que esteja claro no texto da publicação que alguma outra pessoa é responsavel por tal nome e sua indicação, definição, ou descripção.

Artigo 22 - Desejando-se citar, o nome do auctor deve seguir o nome scientifico sem interposição de qualquer signal de pontuação; outras citações que se desejem (data, *sp. n.*, *emend.*, *sensu stricto*, etc.) devem seguir o nome do auctor, ficando delle separadas por virgula ou parentheses. Exemplos: *Primates* Linneu, 1758, ou *Primates* Linneu (1758).

Recommendação — Na abreviação do nome do auctor de uma designação scientifica, o escriptor andará bem si seguir a lista de abreviaturas publicada pelo Museu Zoologico de Berlim (1).

Artigo 23 - Quando se transfere uma especie para um genero differente do original ou se combina o nome especifico com qualquer nome generico differente daquelle com que o primeiro foi publicado originalmente, deve-se reter na notação, mas collocar entre parentheses, o nome do auctor de tal designação especifica. Exemplos: *Taenia lata* Linneu, 1758, e *Dibothriocephalus latus* (Linneu, 1758); *Fasciola hepatica* Linneu, 1758, e *Distoma hepaticum* (Linneu, 1758).

Desejando-se citar o auctor da nova combinação, escreve-se-lhe o nome depois das parentheses. Exemplo: *Limnatis nilotica* (Savigny, 1820) Moquin-Tandon, 1826.

Artigo 24 - Quando se divide uma especie, as especies restrictas a que estava ligado o nome especifico original da especie primitiva, podem receber uma notação que indique, tanto o nome do auctor original, quanto o do revisor. Exemplo: *Taenia solium* Linneu, *partim*, Goeze.

---

(1) Liste der Autoren zoologischer Art-und Gattungsnamen zusammengestellt von den Zoologen des Museum für Naturkunde in Berlin. Berlim, 2. vermehrte Auflage, 8°, 1896.



LEI DE PRIORIDADE

ARTIGO 25 - O nome valido de um genero ou especie só pode ser aquelle sob que um genero ou especie foi primeiro designado, contanto que:

a) Tal nome tenha sido publicado e acompanhado de uma indicação, ou definição, ou descripção; e

b) O auctor tenha applicado os principios de nomenclatura binaria.

Vide Opiniões Nos. 1, 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24, 28, 37-40, 46, 49-54, 56-59, 65-67, 73-78, 84, 85, 87, 88, 90.

NOTA DO TRADUCTOR: Devo frisar aqui que a redacção deste artigo 25, sobre a lei de prioridade, foi modificada e ampliada pelo Congresso Internacional de Zoologia reunido em Budapest, Hungria, de 4 a 9 de setembro de 1927. Com as modificações introduzidas, conforme recommendação unanime da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica, este artigo 25 ficou assim redigido:

ARTIGO 25 — O nome valido de um genero ou especie só pode ser aquelle sob que um genero ou especie foi primeiro designado, contanto que:

a) tal nome (antes de 1.º de janeiro de 1931) tenha sido publicado e acompanhado de uma indicação, ou definição, ou descripção; e

b) o auctor tenha applicado os principios de nomenclatura binaria.

c) Todavia, qualquer nome generico ou especifico publicado após 31 de dezembro de 1930 só terá caracter de aproveitabilidade (e, portanto, tambem de validez) á luz das Regras, si for, e somente depois que for, publicado,

(1) com um resumo de caracteres (ou diagnose; ou definição; ou descripção condensada) que differencie ou distinga o genero ou a especie, de outro genero ou especie;

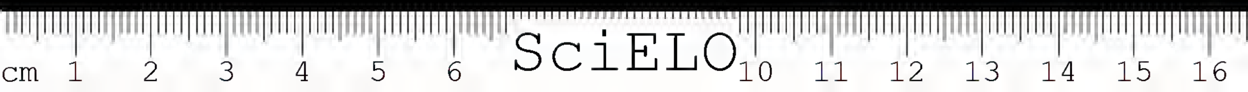
(2) ou com uma clara citação bibliographica de tal resumo de caracteres (ou diagnose; ou definição; ou descripção condensada). Ainda mais,

(3) tratando-se de um nome generico, com a designação definida e clara da especie typo (ou genotypo; ou autogenotypo; ou orthotypo).

Outrosim, a alludida Commissão adoptou ainda a seguinte resolução:

a) pede-se a qualquer auctor que, ao publicar um nome como novo, declare positivamente que elle é novo, que faça esta declaração apenas em uma publicação (isto é, na primeira), e que não junte a data ao nome no momento de sua primeira publicação.

b) pede-se a qualquer auctor que, ao citar um nome generico, especifico, ou subespecifico, indique pelo menos uma vez o do auctor e o anno da publicação do nome citado, ou uma indicação bibliographica completa.



APPLICAÇÃO DA LEI DE PRIORIDADE

ARTIGO 26 - A decima edição do *Systema Naturae* de Linneu (1758) é o trabalho que iniciou a applicação geral consistente da nomenclatura binaria em biologia. Portanto, a data 1758 é acceita como ponto de partida da nomenclatura zoologica e da Lei de Prioridade.

Vide Opiniões Nos. 3, 12, 13, 15, 16, 51, 52.

ARTIGO 27 - A Lei de Prioridade prevalece e por consequencia o mais antigo nome aproveitavel se retém:

a) quando se designa qualquer parte de um animal antes do proprio animal;

b) quando se designa qualquer phase evolutiva antes do adulto;

c) quando os dois sexos de um animal se têm considerado como especies distinctas ou mesmo como pertencentes a generos differentes;

d) quando um animal representa uma successão regular de gerações dissemelhantes que se têm considerado como pertencentes a especies distinctas ou mesmo a generos differentes.

Vide Opiniões Nos. 44, 48.

ARTIGO 28 - Um genero formado pela fusão de dois ou mais generos ou subgeneros recebe o nome valido mais velho, generico ou subgenerico, de seus componentes. Si os nomes tiverem a mesma data, prevalecerá o escolhido pelo primeiro revisor.

A mesma regra é applicavel quando se unem duas ou mais especies ou subespecies para formar uma só especie ou subespecie.

Recommendação — Na ausencia de qualquer revisão previa, recommenda-se o estabelecimento da precedencia pelo seguinte processo:

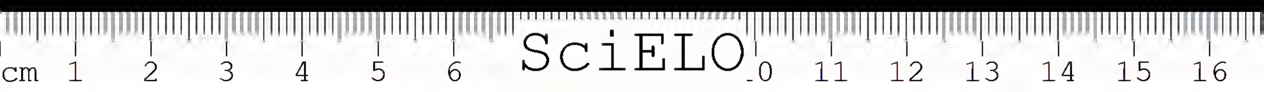
a) Um nome generico acompanhado de especificação de um typo tem precedencia a um nome sem tal especificação. Si todos os generos tiverem, ou nenhum tiver, typos especificados, dá-se preferencia áquelle nome generico cuja diagnose for a mais apropriada.

b) Um nome especifico acompanhado de descripção e gravura tem preferencia a outro acompanhado só de diagnose, ou só de gravura.

c) Em igualdade de condições, deve-se preferir aquelle nome que apparece primeiro na publicação (precedencia de pagina).

Vide Opinião No. 40.

ARTIGO 29 - Si se divide um genero em dois ou mais generos restrictos, o nome valido deve ser retido para um dos generos restrictos. Si um typo tiver



sido estabelecido originalmente para tal genero, retém-se o nome generico para o genero restricto que contenha esse typo.

Recommendação — Para facilitar a citação, recommenda-se que, quando se tomar uma especie mais antiga como typo de um genero novo, se combine realmente o nome della com o novo nome generico que se citará tambem com o nome antigo do genero. Exemplo: *Gilbertella* Eigenmann, 1903, Smithsonion Misc. Coll., v. 45, p 147, typos *Gilbertella alata* (Steindachner) = *Anacyrtus alatus* Steindachner.

Vide Opinião No 10.

ARTIGO 30 - A designação da especie typo de generos deve obedecer ás seguintes regras (a-g), applicaveis na seguinte ordem de precedencia:

Vide Opiniões Nos. 11, 14, 18, 23, 31-33, 42, 43, 45, 62, 68, 69, 71, 79, 81, 86.

I. Casos em que o typo generico é acceito *apenas* por motivo da publicação original:

a) Quando, na publicação original de um genero, uma das especies é positivamente designada como typo, essa especie será acceita como typo, a despeito de quaesquer outras considerações (Typo por designação original). (*Vide Opinião* No. 7).

b) Si, na pubicação original de um genero, o termo *typicus* ou *typus* for usado como um *novo* nome especifico para uma das especies, este será tomado como "typo por designação original".

c) Um genero proposto com uma só especie original toma essa especie como typo (Generos monotypicos). (*Vide Opiniões* 6, 9, 22, 30, 42, 47).

d) Si um genero, sem typo originalmente designado (como em *a*) ou indicado (como em *b*), contém entre suas especies originaes uma que possua com o caracter especifico ou subespecifico o nome generico, seja elle valido ou synonymico, tal especie ou subespecie se torna *ipso facto* typo do genero (Typo por tautonymia absoluta). (*Vide Opiniões* Nos. 16, 33, 35).

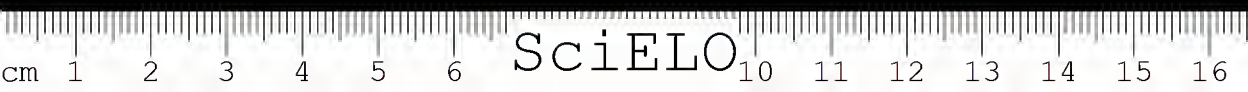
II. Casos em que o typo generico não é acceito apenas por motivo da publicação original.

e) Excluem-se de consideração as seguintes especies na determinação de typos de generos (*Vide Opiniões* Nos. 14, 32, 35, 56):

α. Especies que não estavam incluidas sob o nome generico por occasião da publicação original.

β. Especies que eram *species inquirendae* no ponto de vista do auctor do nome generico, por occasião da publicação.

γ. Especies que o auctor ligou em duvida ao proprio genero por elle creado.



f) Caso um nome generico sem typo originalmente designado seja proposto como substituto para outro nome generico, com ou sem typo, o typo de qualquer dos dois, uma vez estabelecido, torna-se *ipso facto* typo do outro. (*Vide Opiniões* Nos. 9, 46).

g) Si um auctor, ao publicar um genero com mais de uma especie valida, deixa de designar (como em *a*), ou de indicar (como em *b* e *d*) o typo, este pode ser escolhido por qualquer auctor subsequente e tal designação não está sujeita a mudança (Typo por designação subsequente). (*Vide Opiniões* Nos. 6, 9, 10, 32, 56).

O sentido da expressão "escolher o typo" deve ser tomado ao pé da letra. Menção de uma especie como illustração ou exemplo de um genero, não constitue selecção de um typo.

III. *Recommendações* — Na escolha de typos por designação subsequente, os auctores farão bem em seguir as seguintes recommendações:

h) Em caso de generos linneanos, escolher como typo a especie mais commum ou a medicinal (Regra linneana, 1751).

i) Si um genero sem typo designado contém entre as suas especies originaes uma que possua como designação especifica ou subespecifica, quer valida, quer synonymica, um nome que seja virtualmente o mesmo que o generico, ou da mesma origem ou da mesma significação que elle, a escolha deve recahir em tal especie no acto da designação do typo, a menos que tal escolha seja fortemente contraindicada por outros factores (Typo por tautonymia virtual). Exemplos: *Bos taurus, Equus caballus, Ovis aries, Scomber scombrus, Sphaerostoma globiporum;* contraindicada em *Dipetalonema* (comparar com a especie *Filaria dipetala*, de que apenas foi descripto um sexo, baseado em um exemplar e não estudado minuciosamente).

j) Si o genero contém especies exoticas e não exoticas no ponto de vista do auctor original, a escolha do typo deve recahir em especie não exotica.

k) Si algumas das especies originaes tiverem sido classificadas em outros generos, deve-se dar preferencia ás especies que houverem permanecido no genero original (Typo por eliminação).

l) Especies baseadas em exemplares sexualmente maduros devem ter precedencia a especies baseadas em formas larvarias ou immaturas.

m) Dar preferencia a especies designadas pelos nomes *communis, vulgaris, medicinalis* ou *officinalis*.

n) Dar preferencia á especie mais bem descripta, figurada, ou conhecida, ou mais facilmente obtenivel ou áquella de que se pode obter um exemplar typo.

o) Dar preferencia a uma especie pertencente a um grupo que contenha um numero tão grande quanto possivel de especies (Regra de De Candolle).

p) Em generos parasitarios escolher, si possivel, uma especie que occorra no homem ou algum animal usado como alimento, ou em alguma especie hospedeira muito commum e espalhada.

q) Em igualdade de condições, preferir uma especie que o auctor do genero tenha realmente estudado quando, ou antes que, propôs o genero.

r) Tratando-se de escriptores que costumam collocar como cabeça ("*chef de file*") uma certa especie principal ou typica e descrever as demais por meio de citação comparativa com ella, a escolha do typo deve recahir na alludida especie.

s) Tratando-se de auctores que adoptavam a "regra da primeira especie" como criterio para a fixação dos typos genericos, as primeiras especies por elles designadas devem ser tomadas como typos dos respectivos generos.

t) Em igualdade de condições, deve prevalecer a precedencia de pagina na escolha do typo.

ARTIGO 31 - A divisão de uma especie em duas ou mais especies restrictas está sujeita ás mesmas regras que a divisão de um genero. Mas um nome especifico que indubitavelmente se baseie em um erro de identificação, não pode ser retido para a especie mal determinada mesmo que ella seja mais tarde collocada em genero differente. Exemplo: *Taenia pectinata* Goeze, 1782 = *Cittotaenia pectinata* (Goeze), porém a especie erroneamente determinada por Zeder, 1800, como "*Taenia pectinata* Goeze" = *Andrya rhopalocephala* (Riehm); a especie de Zeder não recebe o nome de *Andrya pectinata* (Zeder).

Vide Opinião No. 13.

REJEIÇÃO DE NOMES

ARTIGO 32 - Um nome generico ou especifico, uma vez publicado, não pode ser rejeitado por motivo de falta de propriedade, nem mesmo por seu auctor. Exemplos: Nomes como *Polyodon*, *Apus*, *albus*, etc., uma vez publicados, não devem ser rejeitados pela allegação de que indicam caracteres contradictorios aos apresentados pelos animaes assim denominados.

ARTIGO 33 - Um nome não deve ser rejeitado por causa de tautonymia, isto é, por serem identicos ao nome generico o nome especifico ou o subespecifico. Exemplos: *Trutta trutta*, *Apus apus apus*.

ARTIGO 34 - Um nome generico deve ser rejeitado como homonymo quando houver sido previamente usado para algum outro genero [1] de animaes. Exemplo:

---

(1) Além de revistas e "nomenclatores" especiaes sobre varios grupos, as seguintes publicações são de grande utilidade para os auctores, porque indicam si um dado nome subgenerico, generico ou supergenerico, está preoccupado e, assim, sua consulta antes da creação de novos nomes evitará muita confusão e futura mudança de designações:

— C. D. SHERBORN. Index animalium sive index nominum quae ab A. D. 1758, generibus et speciebus animalium imposita sunt. Societatibus eruditorum adjuvantibus a Carlo Davies Sherborn confectus. Sectio I a kalendis januarii, 1758, usque ad finem decembris, 1800. Cantabrigiae, 1902, 8º.

A continuação sobre 1801-1850 está agora apparecendo em partes.

— S. H. SCUDDER. Nomenclator zoologicus. Lista alphabetica de todos os nomes genericos que têm sido empregados por naturalistas para animaes recentes e fosseis desde os tempos mais remotos até o fim do anno de 1879. Em 2 partes: I. Lista supplementar. II. Index universal. Washington, 1882, 8º.

— C. O. WATERHOUSE. Index zoologicus. Lista alphabetica de generos e subgeneros propostos para uso em zoologia e citados no Zoological Record, 1880-1900 e 1901-1910, juntamente com outros nomes não incluidos no No-

Trichina Owen, 1835, nematoide, é rejeitado como homonymo de *Trichina* Meigen, 1830, insecto.

Vide Opiniões Nos. 12, 29, 83.

CODIGO DE ETHICA

Sem se arrogar o arbitro de pontos de ethica geral, a Commissão está persuadida de que ha uma face deste assumpto sobre que ella é competente para falar, e, assim, a respeito suggere ao Congresso a adopção da seguinte resolução:

Considerando que — a experiencia tem demonstrado que auctores não raramente publicam por inadvertencia, como novas designações de generos ou especies, nomes que estão preoccupados, e

Considerando que — a experiencia tem demonstrado que ouros auctores, ao descobrirem tal homonymia, têm publicado novos nomes para substituir aquelles homonymos,

Fica resolvido que — quando algum zoologo notar que o nome generico ou especifico publicado por qualquer auctor vivo como novo é realmente um homonymo e, pois, inaproveitavel á luz dos artigos 34 e 36 das Regras de Nomenclatura, sua acção no caso deve ser, do ponto de vista da ethica profissional, notificar ao alludido auctor os factos encontrados e dar-lhe ensejo amplo de propor um nome em substituição.

ARTIGO 35 - Um nome especifico deve ser rejeitado como homonymo quando tiver sido previamente usado para alguma outra especie ou subespecie do mesmo genero. Exemplo: *Taenia ovilla* Rivolta, 1878 (sp. n.) é rejeitado como homonymo de *T. ovilla* Gmelin, 1790.

Quando, por consequencia da união de dois generos, dois animaes differentes, que possuam o mesmo nome especifico ou subespecifico, são incluidos em um genero, o nome especifico ou subespecifico mais recente deve ser rejeitado como homonymo.

Nomes especificos da mesma origem e siginificação serão considerados homonymos si se distinguirem entre si apenas pelas seguintes differenças:

a) Uso de *ae*, *oe* e *e*, como *caeruleus*, *coeruleus*, *ceruleus*; *ei*, i e *y*, como *chiropus*, *cheiropus*; *c* e *k* como *microdon*, *mikrodon*.

b) Aspiração ou não aspiração de uma consoante, como *oxyryncus*, *oxyrhynchus*.

---

menclator Zoologicus de S. H. Scudder. Compilado *** por Charles Owen Waterhouse e editado por David Sharp Londres, 1902 e 1912, 8°.

— The Zoological Record, XXXVIII (*et seq.*). Contém citações de literatura zoologica relativa sobretudo ao anno de 1901 (*et seq.*). Londres, 1902 (*et seq.*), 8°. Indice de nomes de novos generos e subgeneros.

— Register zum zoologischer Anzeiger. Publicado por J. V. Carus. Annos 1-10(1878-1887), 11-15(1888-1892), 16-20(1893-1897), 21-25(1898-1902). Lipsia, 1889, 1893, 1899, 1903, 8°.

— Nomenclator animalium generum et subgenerum. Está agora (1926 *et seq.*) sendo publicado em partes pela Preussische Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

c) Presença ou ausencia de um *c* antes de *t*, como *autumnalis*, *auctumnalis*.

d) Consoante simples ou geminada: *litoralis*, *littoralis*.

e) Terminações *ensis* e *iensis* em nomes geographicos, como *timorensis*, *timoriensis*.

ARTIGO 36 - Homonymos rejeitados não podem ser usados. Synonymos rejeitados podem ser usados de novo no caso de restauração de grupos erroneamente suppressos. Exemplo: *Taenia giardi* Moniez, 1879 foi suppresso como synonymo de *Taenia ovilla* Rivolta, 1878; mais tarde foi descoberto que *Taenia ovilla* estava preoccupado (*Taenia ovilla* Gmelin, 1790). *Taenia ovilla*, 1878, é suppresso como homonymo e não pode ser mais usado; considerado "natimorto", não pode ser revivido mesmo que a especie seja collocada em outro genero (*Thysanosoma*). *Taenia giardi*, 1879, que foi suppresso como synonymo, torna-se valido como resultado da suppressão do homonymo *Taenia ovilla* Rivolta.

Recommendações — E' conveniente evitar a introducção de novos nomes genericos que difiram de nomes genericos já em uso, pela terminação ou por uma pequena variação na orthographia que possa determinar confusão. Todavia, uma vez introduzidos, taes nomes não devem ser rejeitados por essa razão. Exemplos: *Picus*, *Pica*; *Polyodus*, *Polyodon*, *Polyodonta*, *Polyodontas*, *Polyodontus*; *Macrodon*, *Microdon*.

A mesma recommendação applica-se a novos nomes especificos em qualquer genero. Exemplos: *necator*, *necatrix*; *furcigera*, *furcifera*; *rhopalocephala*, *rhopaliocephala*.

Si dois ou mais adjectivos são derivados da radical de um nome geographico, não é aconselhavel usar mais de um delles como nome especifico no mesmo genero, mas, uma vez introduzidos, não se devem rejeitar por essa razão. Exemplos: *hispanus*, *hispanicus*; *moluccensis*, *moluccanus*; *sinensis*, *sinicus*, *chinensis*; *ceylonicus*, *zeylanicus*.

Esta recommendação applica-se tambem a outras palavras derivadas da mesma radical e distinctas entre si apenas pela terminação ou por uma simples mudança na orthographia.

SUSPENSÃO DAS REGRAS EM CERTOS CASOS

FICA RESOLVIDO: - Que, por este documento, se confere poder plenario á Commissão Internacional sobre Nomenclatura Zoologica, para, em nome deste Congresso, suspender as Regras quando applicadas em um caso dado qualquer, desde que, em seu julgamento, da estricta applicação das Regras resulte claramente maior confusão do que uniformidade, *com a condição*, todavia, de que, durante pelo menos um anno, se dê noticia em duas ou mais das seguintes publicações: Bulletin de la Societé Zoologique de France, Monitore Zoologico, Nature, Science (N. Y.) e Zoologischer Anzeiger, de que se está considerando a possibilidade da suspensão das Regras applicadas a tal caso, tornando-se assim possivel a zoologos, principalmente especialistas no grupo em jogo, apresentarem argumentos a favor ou contra a suspensão em estudo; e tambem *com a condição*

de que a votação na Commissão resulte unanime em favor da suspensão; e finalmente *com a condição* de que, si da alludida votação resultar uma maioria de dois terços da Commissão completa, mas não unanimidade a favor da suspensão, a Commissão fique desde logo auctorizada a submetter os factos á consideração do primeiro Congresso Internacional;

FICA RESOLVIDO: - Que, no caso de uma questão ser affecta ao Congresso, nas condições acima descriptas, com uma maioria de dois terços da Commissão em favor da suspensão, mas sem um voto unanime, caberá ao Presidente da Secção de Nomenclatura nomear um conselho especial de 3 membros, dos quaes dois pertencentes á Commissão (um que tenha votado de um modo e outro que o tenha feito de modo opposto na questão) e o terceiro um ex-membro da Commissão que não tenha expresso em publico sua opinião sobre o caso; e que este conselho especial deverá rever os factos apresentados e seu relatorio, adoptado por maioria ou por unanimidade, será final e inappellavel no que concerne ao Congresso;

FICA RESOLVIDO: - Que a auctoridade precitada trate, na primeira occasião e especialmente, de questões de nomes de phases larvarias e da transferencia de nomes de um genero para outro; e

FICA RESOLVIDO: - Que o Congresso não somente approva inteiramente o plano que foi iniciado pela Commissão, de tratar com comitês especiaes a respeito de determinados grupos em qualquer caso, mas ainda auctoriza e instrue a Commissão a continuar e desenvolver essa orientação.

Vide Opiniões Nos. 76, 80, 82, 89, 90.

——X——

APPENDICE

A. — E' muito desejavel que a proposta de cada novo grupo systematico seja acompanhada de uma diagnose, tanto individual quanto differencial, do grupo, em inglês, francês, alemão, italiano, ou latim.

Esta diagnose deve declinar o nome do museu em que o exemplar typo foi depositado e dar o numero (catalogo do museu) do referido exemplar

Recommenda-se que nas descripções publicadas de uma nova especie ou subespecie se designe e rotule como *typo* apenas um exemplar, ficando como *paratypos* os demais exemplares examinados pelo auctor na mesma occasião.

B. — Em publicações feitas em outras linguas que não o inglês, francês, alemão, italiano, ou latim, é desejavel que a explicação das gravuras appareça traduzida em uma destas linguas.

C. — O systema metrico de pesos e medidas e o thermometro centigrado de Celsius são adoptados como padrão. O *micron* (0,001 mm.), representado pela letra grega μ, é adoptado como unidade de medida em trabalhos de microscopio.

D. — A indicação de augmento ou de reducção, tão necessaria á comprehensão de uma illustração, deve ser expressa antes em algarismos do que pela menção do systema de lentes usado.

E. — A indicação de augmento ou reducção de um objecto é geralmente linear. Usa-se o signal de multiplicação para augmento e o de fracção para reducção. Exemplos: × 50 indica que o objecto está augmentado 50 vezes. $\frac{1}{50}$ significa que elle está reduzido 50 vezes.

Si se deseja especificar que o augmento é em linha, superficie, ou massa, deve-se representar assim: × 50^1 para indicar augmento numa dimensão; × 50^2 para indicar augmento em area; × 50^3 para indicar augmento em volume.

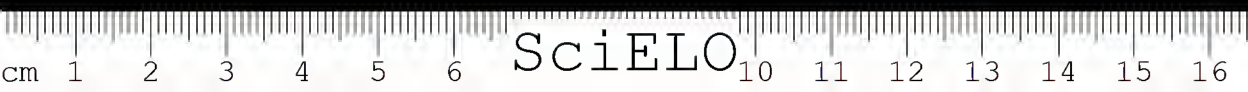
F. — *Transliteração de palavras gregas* — A seguinte lista indica a maneira por que se devem transliterar palavras gregas:

	ε = e	(ὑάλεος)	*Hyalea*, e não *Hyalaea*
	η = e	(πειρήνη)	*Pirena*, e não *Pirina*
final	η = a	(πειρήνη)	*Pirena*, e não *Pirene*
	θ = th	(τηθύς)	*Tethys*, e não *Tetys*
	ι = i	(βαλιός)	*Balia*, e não *Balea*
	κ = c	(ἱπποκρήνη)	*Hippocrena*, e não *Hippochrenes*
	ξ = x	(ξένος)	*Xenus*, *Xenophora*
	ρ = r	(πτερόν)	*Pterum*
	υ = y	(ὕβος)	*Hybolithus*, e não *Hibolites*
	αι = ae	(λιμναῖος)	*Limnaea*, e não *Limnea*
	αυ = au	(γλαυκός)	*Glaucus*
	ει = i	(χεῖλος)	*Chilostomum*, e não *Cheilostoma*
	ευ = eu	(εὖρος)	*Eurus*
	φ, οι = oe	(οἰκέω)	*Dioeca*, *Dendroeca*, e não *Dioica*, *Dendroica*
final	ον = um	(ἐφίππιον)	*Ephippium*, e não *Ephippion*
final	ος = us	(ὀμφαλός)	*Euomphalus*, e não *Euomphalos*
	ου = u	(λουτήριον)	*Luterium*, e não *Loterium*
	γγ = ng	(ἀγγαρεία)	*Angaria*, e não *Aggaria*
	γχ = nch	(ἀγχιστομον)	*Anchistomum*, e não *Angistoma*
	γκ = nc	(ἄγκιστρον)	*Ancistrodon*, e não *Agkistrodon*
	ῥ = rh	(ῥέα)	*Rhea*
	ἑ = he	(ἑρμαία)	*Hermaea*, e não *Ermaea*

G. — *Transliteração de nomes geographicos e proprios* — Os nomes geographicos de paises que empregam caracteres latinos se devem escrever com a orthographia da região em que se originam.

Os seguintes paragraphos applicam-se somente aos nomes geographicos de paises que não têm alphabeto verdadeiro ou usam letras differentes das latinas.

Nomes de logares, estabelecidos por longo uso, conservam sua orthographia usual. Exemplos: *Argel*, *Moscou*.



1. As vogaes *a, e, i* e *o* pronunciam-se como em francês, italiano, espanhol [e português], ou alemão. A letra *e* nunca é muda.

2. O som francês *u* é representado por *ü* com dierese, como em alemão

3. O som francês *ou* é representado por *u*, como em italiano, espanhol [ou português], alemão, etc.

4. O som francês *eu* é representado por *ö*, pronunciado como na palavra francesa *oeil*.

5. O som longo de uma vogal é indicado por um accento circumflexo; o som interrompido é indicado por um apostropho.

6. As consoantes *b, d, f, j, k, l, m, n, p, q, r, t, v*, e *z* são pronunciadas como em francês

7. As letras *g* e *s* têm sempre o som duro, como nas vogaes francesas: *gamelle* e *sirop*.

8. O som representado em francês por *ch* é designado por *sh*. Exemplos: *Shérif*, *Kashgar*.

9. *Kh* representa a gutural aspera e *gh*, a guttural branda dos arabes.

10. *Th* representa o som com que termina a palavra inglesa *path* (θ em grego). *Dh* representa o som inicial do vocabulo inglês *those* (δ em grego).

11. Fora de tal emprego (9 e 10) da letra *h* modificando a que a precede, *h* é sempre aspirado; o apostropho, por conseguinte, não se usa jamais antes de uma palavra que comece por *h*.

12. A semivogal representada por *y* é pronunciada como em *yole*.

13. A semivogal *w* é pronunciada como no vocabulo ingles *William*.

14. Os sons duplos *dj*, *tch*, *ts*, etc., indicam-se por letras correspondentes aos sons que os compõem. Exemplo: *Matshim*.

15. O *ñ* é pronunciado *gn* como no francês *seigneur* [*nh* em português].

16. As letras *x*, *c* e *q* não se usam, por serem duplicatas de outras letras que representam os mesmos sons; mas *q* pode servir para indicar o arabe *qaf* e a aspirada branda pode ser empregada para representar o arabe *ain*.

Deve-se tentar indicar, tão exactamente quanto possivel, por meio das letras citadas acima, a pronuncia local, sem procurar dar uma representação completa de todos os sons que se ouvem.

NOTA DO TRADUCTOR: — Algumas destas indicações dirigem-se naturalmente aos povos de lingua inglesa.

RESUMOS DAS OPINIÕES EMITTIDAS

1. **Significação da palavra "indicação" no Art. 25a.** — A palavra "*indicação*" no Art. 25a deve ser interpretada como segue:

A. Em relação a nomes *especificos* corresponde a uma "*indicação*": (1) uma citação bibliographica, ou (2) uma gravura publicada (illustração), ou (3) uma citação definida de um nome anterior para o qual se propõe uma nova designação.

B. Em relação a nomes *genericos*: (1) uma citação bibliographica, ou (2) uma citação definida de um nome anterior para o qual se propõe uma nova designação, ou (3) a citação ou designação de uma especie typo.

Em caso nenhum se deve considerar a palavra "*indicação*" como correspondente a rotulos de museu, exemplares de museu, ou nomes vernaculos.

2. **Natureza de um nome systematico.** — A Commissão é de opinião unanime que um *nome*, no sentido do Codigo, corresponde á designação pela qual são conhecidos os objectos reaes. Em outras palavras, nós designamos os proprios objectos, e não a nossa concepção de taes objectos. Nomes baseados em formas hypotheticas, por conseguinte, não têm significação em nomenclatura e de nenhum modo merecem consideração á luz da Lei de Prioridade.

Exemplos: *Pithecanthropus* Haeckel, 1866, sendo o nome de um genero hypothetico, não tem significação á luz do Codigo e, portanto, não invalida *Pithecanthropus* Dubois, 1894; *Gigantopora minuta* Looss, 1907, g. n., sp. n., não tem significação alguma á luz do Codigo, porquanto é considerado como nome de uma unidade phantastica, baseada em nenhum objecto real.

3. **Situação de publicações datadas de 1758.** — A decima edição do "Systema Naturae" de Linneu appareceu muito cedo no anno de 1758 e, por motivos praticos, pode-se presumir que esta data seja: primeiro de janeiro de 1758. Assim, quaesquer outras publicações zoologicas, datadas de 1758, se podem presumir como tendo apparecido depois do dia primeiro de janeiro. No que respeita á data, todas essas publicações podem, portanto, ser julgadas merecedoras de consideração debaixo da Lei de Prioridade.

4. **Situação de certos nomes publicados como manuscriptos.** — Nomes manuscriptos têm entrada em nomenclatura quando impressos em ligação com as disposições do Art. 25, e a questão de sua validez não é influenciada pelo facto de taes nomes serem acceitos ou rejeitados pelo auctor responsavel por sua publicação.

5. **Situação de certos nomes pre-linneanos reimpressos após 1757.** — Um nome pre-linneano, inelegivel por causa de sua publicação antes de 1758, não se torna elegivel simplesmente por ser citado ou reimpresso, com sua diagnose original, depois de 1757. Para tornarem-se elegiveis sob o Codigo, taes nomes devem ser reforçados por adopção ou acceitação por parte do auctor que publica a reimpressão. Exemplos: A citação, posterior a 1757, de uma referencia bibliographica sobre um trabalho anterior a 1758 não firma nomes technicos por ventura contidos na alludida referencia; a situação synonymica de nomes pre-linneanos, como occorre na decima edição do «Systema Naturae» de Linneu, não firma taes nomes sob o Codigo.

6. **No caso de um genero *A* Linneu, 1758, com duas especies Ab e Ac.** — Quando um auctor subsequente divide o genero A, especies Ab e Ac, deixando o genero A apenas com a especie Ab e o genero C, monotypico, com a especie Cc, esse auctor deve ser considerado como tendo fixado o typo do genero A [Vide Artigo 30a].

7. **Sobre a interpretação da expressão "*g.n., sp.n.*" á luz do Artigo 30a** — A expressão "g.n., sp.n" usada na publicação de um novo genero, do qual nenhuma outra especie é aliás designada como genotypo, deve ser acceita como designação, á luz do Artigo 30a.

8. **Sobre a retenção de ii ou i em nomes especificos patronymicos sob o Artigo 14c e Artigo 19.** — Patronymicos especificos, publicados originalmente com a terminação *ii* (como *schrankii*, *ebbesbornii*) devem, de accordo com o Artigo 19, ser conservados



em sua forma original, a despeito do Artigo 14c que estabelece que elles deviam ter sido formados apenas como um *i*.

9. **Applicação do nome de um genero composto a um dos seus elementos que necessite de nome.** — Depende de varias circumstancias a decisão sobre si o nome de um genero composto, quando formado inteiramente de generos mais velhos, é applicavel a um dos seus elementos componentes que necessite de um nome. Ha circumstancias sob que tal nome pode ser usado, outras sob que não o pode ser (Art. 30)

10. **Designação de genotypos para generos publicados com identicos limites.** — Si dois generos com os mesmos limites são formados independentemente por differentes auctores, sem designação de genotypos, qualquer auctor subsequente pode designar os genotypos (Art. 30g), e, si os typos designados não são identicos especificamente, os dois nomes genericos podem (em igualdade de condições) ser usados para generos restrictos que contenham os alludidos typos [Vide Art. 25].

11. **Designação de genotypos por Latreille, 1810.** — A "Table des genres avec l'indication de l'espèce qui leur sert de type», in «Considérations générales» de Latreille (1810), deve ser acceita como designação de typos dos generos nella incluidos [Vide Art. 30].

12. *Stephanoceros fimbriatus* **(Goldfuss, 1820) vs.** *Stephanoceros eichhornii* **Ehrenberg, 1832.** — O nome generico *Stephanoceros*, 1832, deve ser usado de preferencia a *Coronella*, 1820 (preoccupado, 1768); o nome especifico *fimbriatus*, 1820 tem precedencia a *eichhornii*, 1832, que é considerado (Ehrenberg, 1832 b, 125, e 1838 a, 400-401) como redenominação de *fimbriatus*, 1820. Ehrenberg teve razão em rejeitar *Coronella*, 1820, mas errou em rejeitar *fimbriatus*, 1820, não havendo razão apparente para perpetuar o seu erro

13. **Nome especifico do caranguejo da areia.** — O nome pre-linneano (1743) *arenarius* de Catesby não é approveitavel á luz do Codigo, embora tenha sido "reimpresso" em 1771; *quadratus*, 1793 affirma-se que está preoccupado; *albicans*, 1802, sendo o nome especifico immediato na lista, torna-se valido diante dos argumentos apresentados

14. **Especie typo de** *Etheostoma* **Rafinesque, 1819.** — A designação de *E. blennioides* Rafinesque, 1819, como typo de *Etheostoma* Rafinesque, 1819, conforme fez Agassiz em 1854, não é invalidada, por ter Agassiz usado, como base para sua diagnose generica, caracteres tirados de uma erronea determinação especifica de 1839 Não somente Agassiz affirmou claramente que "*Eth. blennioides* Raf." *era typo de* "*Etheostoma* Raf.", mas ainda, mesmo que se tome em consideração a questão da identificação erronea de *E. blennioides* por Kirtland, a conclusão a tirar é que esta identificação erronea não excluiu deste nome especifico os exemplares originaes de *E. blennioides*; pelo contrario o nome usado por Kirtland, 1839, ainda incluia os exemplares typo; retirando-se agora os exemplares erroneamente determinados em 1839, os quaes pelo Artigo 30e (a) são excluidos de consideração na designação de genotypo, permanecem os exemplares typo originaes de 1819, os quaes, diante dos argumentos apresentados, representam o typo do genero

15. *Craspedacusta sowerbii* **Lankester, 1880,** *g.n., sp.n.* **vs.** *Limnocodium victoria* **Allman, 1880,** *g.n., sp.n.*, *Medusa* **de agua doce.** — *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 17 de junho de 1880, tem nitida prioridade sobre *Limnocodium victoria* Allman, 24 de junho de 1880 A apresentação de um trabalho a uma sociedade scientifica não constitue publicação no sentido do Codigo. A Commissão não tem auctoridade para sanccionar uso que infrinja as disposições do Codigo [Vide Capitulo "Suspensão das Regras", p. 249].

16. **Situação de nomes especificos pre-binominaes (publicados antes de 1758) sob o Art 30d.** — Ao se decidir sobre a presença de um caso de absoluta tautonymia (sob o Art. 30d), deve-se acceitar a citação, em synonymia, de um nome especifico prebinominal claro, como prova de sua conformidade com as exigencias do Art. 30d. Exemplos: *Equus caballus* (*Equus* citado em synonymia no sentido do "cavallo"), *Alca torda* (*Alca* citado em synonymia no sentido da «Alca»).

17. **Devem acceitar-se os generos de Weber, 1795?** — O Nomenclator Entomologicus de Weber, 1795, satisfaz os requisitos do Artigo 25 e, pois, devem ser acceitos os generos nelle incluidos desde que individualmente estejam de accordo com as condições do Codigo.

18. **Typo de *Hydrus* Schneider, 1799.** — De accordo com os argumentos, *caspius* Schneider, syn. *hydrus* Pallas, é o typo de *Hydrus* Schneider. [Vide Art. 30d].

19. ***Plesiops* vs. *Pharopteryx*.** — Diante dos dados, não está claro si, por sua natureza, este caso é de nomenclatura ou de zoologia. Tanto quanto a evidencia permitte julgar, a pergunta sobre si Rüppell errou em acceitar *Plesiops* como identico a *Pharopteryx* deve ser respondida do ponto de vista systematico. Si, em face de nossa actual concepção dos limites genericos, Rüppell tinha razão, não ha motivo apparente para não se acceitar a sua decisão no terreno da nomenclatura.

20. **Devem-se acceitar os generos de Gronow, 1763?** — Gronow, 1763, é binario, embora não consistentemente binominal. O Artigo 25 requere que um auctor seja binario e o Artigo 2 requere que os nomes genericos sejam uninominaes. A' luz destes Artigos, os generos de Gronow devem ser acceitos como preenchendo as condições prescriptas pelo Codigo para o competente aproveitamento de um nome [Vide Opinião 89].

21. **Devem-se acceitar os generos de Klein, 1744, reimpressos por Walbaum, 1792?** — Quando Walbaum em 1792 reimprimiu em forma condensada (mas não acceitou) os generos de Klein de 1744, elle com esse acto não deu aos generos de Klein situação alguma em nomenclatura e, por conseguinte, os generos de Klein não se tornam aproveitaveis á luz do Codigo presente, pelo facto de terem sido citados por Walbaum.

22. ***Ceraticthys* vs. *Cliola*.** — Quaesquer que tenham sido as intenções originaes de Baird, elle e Girard publicaram inicialmente (1853) *Ceraticthys* como um genero monotypico, descrevendo o genotypo (*C. vigilax*) e não dando indicação alguma de que não pretendiam com isso publicar um "g.n., sp.n.". Diante do Artigo 30c, *vigilax* é o typo de *Ceraticthys*.

23. ***Aspro* vs. *Cheilodipterus* ou *Ambassis*.** — Diante dos argumentos apresentados, *Centropomus macrodon* pode ser considerado typo de *Aspro* 1802, supprimindo-se este ultimo como um synonymo de *Cheilodipterus* e salvando-se, assim, *Ambassis*.

24. ***Antennarius* Commerson, 1798, e Cuvier, 1817, vs. *Histrio* Fischer, 1813.** — *Antennarius* Commerson é um nome uninominal (Art. 2) de um auctor que usou uma nomenclatura binaria (embora não binominal) (Art. 25). Adquiriu valor nomenclatorial em virtude de sua publicação por Lacépède em 1798 e deve trazer esta indicação ao invés de Cuvier, 1817. Portanto, não é necessario supprimil-o em beneficio de *Histrio*, 1813. [Vide Opinião 89].

25. ***Damesiella* Tornquist, 1899, vs. *Damesella* Walcott, 1905.** — Diante das Recommendações do Artigo 36, não é necessario rejeitar *Damesella*, 1905, em virtude da existencia de *Damesiella*, 1898 (1899?).



26. *Cypsilurus* vs. *Cypselurus.* — Em vista do numero de erros typographicos em Swainson 1838 e 1839, a Commissão é de opinião que *Cypsilurus* é um erro typographico evidente que deve ser correcto para *Cypselurus.*

27. *Ruppelia* e *Rupellia* vs. *Rüppellia.* — Desde que é evidente um erro typographico, *Ruppelia* e *Rupellia* devem ser correctos para *Rüppellia.*

28. **Deve-se dar prioridade á "Nouvelle Classification" de Meigen, 1800, em relação á sua "Versuch" de 1803?** — Os nomes genericos contidos na "Nouvelle Classification" de Meigen, 1800, devem ter precedencia aos usados em sua "Versuch" 1803 em todos os casos em que os primeiros forem considerados validos sob o Codigo Internacional.

29. *Pachynathus* vs. *Pachygnathus.* — Baseada no argumento constante da Opinião 26 e na existencia do nome anterior *Pachygnathus*, 1834, Arach., a Commissão é de parecer que *Pachynathus* Swainson, 1839 deve ser suppresso.

30. **Generos de aves Swainson, 1827.** — Os generos de aves, publicados por Swainson no Philosophical Magazine de 1827, são monotypicos e, de accordo com o Artigo 30c, as especies ali mencionadas são typos dos seus respectivos generos. Por consequencia, estes typos devem ter precedencia aos typos de Swainson designados, mais tarde, no Zoological Journal de 1827

31 *Columbina* vs. *Chaemepelia* — Em 1840 Gray designou *Columba passerina* Linneu como typo de *Columbina* Spix. Como esta especie não é uma das originaes de *Columbina* Spix, a designação do typo por Gray não é valida e *Columbina* (*) permanece sem um typo designado. O typo valido de *Chaemepelia* Swainson é *Columba passerina* Linneu, designada por Gray em 1841.

[(*) Nota escripta por Stejneger (membro da Commissão): "Ao ser redigida a Opinião 31, o auctor não tinha visto a segunda edição dos Generos de Aves de Gray, publicada em 1841, nem os documentos apresentados na occasião tratavam claramente da questão e, porisso, lhe escapou que *Columbina strepitans* Spix fora designada por Gray em 1841, p.75, como typo de *Columbina.* Este acto de Gray é indubitavelmente valido e, portanto, o typo de *Columbina* é *C. strepitans* Spix. Em vista deste facto trazido ao conhecimento da Commissão pelo Sr. W. E. Clyde Todd, a Opinião 31 fica aqui mudada, de accordo com elle e será submettida aos membros para a devida approvação

Allen, 1911, Science, 336, designou *griseola* Spix como typo de *Columbina* Spix, 1825"].

32 **Typo do genero *Sphex*.** — De accordo com os argumentos apresentados, *sabulosa* é o typo de *Sphex* Linneu, 1758.

33. **Typo do genero *Rutilus* Rafinesque, 1820.** — *Cyprinus rutilus* é o typo de *Rutilus* Rafinesque, 1820. *Rutilus plargyrus* é o typo de *Plargyrus* Rafinesque, 1820.

34. *Æshna* vs. *Æschna.* — Desde que a publicação original não evidencia a derivação da palavra, a graphia original *Æshna* deve ser conservada.

35. **Typos de generos de auctores binarios mas não binominaes.** — Na determinação do typo de um genero, a selecção deve limitar-se ás especies incluidas no nome generico por occasião de sua publicação original, tivessem ou não ellas sido designadas binomi-

nalmente. Si, todavia, um nome generico é proposto distinctamente como substituto para outro nome generico anterior, as especies deste devem ser tomadas em consideração.

36. **Emenda de** *Trioxocera, Dioxocera* **e** *Pentoxocera*. — A Commissão é de parecer que a publicação original de *Trioxocera, Dioxocera* e *Pentoxocera* evidencia a presença de um erro de transcripção (ou transliteração) e que estes nomes devem ser emendados para *Triozocera, Diozocera* e *Pentozocera*.

37. **Devem acceitar-se os generos da "Ornithologia" de Brisson, 1760?** — Os nomes genericos de aves usados por Brisson (1760) são aproveitaveis sob o Codigo.

38. **Situação dos nomes latinos em Tunstall, 1771.** — Os nomes latinos usados na Ornithologia Britanica de Tunstall, 1771, são aproveitaveis desde que sejam identificaveis por meio das referencias que fez de bibliographia, paginas e illustrações, ou pelas citações de nomes ingleses de Pennant, 1768, ou de nomes franceses de Brisson, 1760.

39. **Situação dos nomes latinos em Cuvier, 1800.** — Os nomes latinos dos quadros systematicos usados por Cuvier, 1800 ("Leçons d'anatomie comparée"), são aproveitaveis desde que sejam identificaveis por meio das citações bibliographicas constantes da pagina xix da Introducção.

40. *Salmo eriox* **vs.** *S. trutta* **e** *S. fario; Eniochus acuminatus* **vs.** *H. macrolepidotus*. — Diante dos argumentos apresentados, não é necessario substituir *fario* ou *trutta* por *eriox;* a selecção de *macrolepidotus* por Cuvier (1817) tem precedencia sobre a selecção de *acuminatus* por Jordan & Seale, 1906.

41. *Athlennes* **vs.** *Ablennes*. — Desde que a publicação original revela um evidente *lapsus calami*, o nome *Athlennes* deve ser correcto para *Ablennes*.

42. **Typo de** *Carapus* **Rafinesque, 1810.** — *Carapus* Rafinesque, 1810, é monotypico, typo *Gymnotus acus* Linneu.

43. **Situação de generos cujas especies typo estão citadas sem descripção addicional.** — Os caracteres attribuidos a *Teleognmus, Isoplata, Alloderma*, e *Aphobetoideus* abrangem os generos e as especies typo, e os nomes genericos especificos respectivos estão publicados no sentido do Codigo.

44. *Leptocephalus* **vs.** *Conger*. — *Leptocephalus* Gronovius, 1763 & Gmelin, 1789, typo *morrisii*, tem precedencia a qualquer nome generico posterior, pelo qual se tenha designado a phase adulta deste animal. [Vide Opinião 89].

45. **Typo de** *Syngnathus* **Linneu, 1758.** — Até onde se pode julgar pelos argumentos apresentados, o typo de *Syngnathus* Linneu, 1758, não foi jamais claramente designado e não ha objecção a que se designe como tal a especie *acus* Linneu, em observancia ao costume e conveniencia geraes.

46. **Situação de generos publicados originalmente sem designação clara de alguma especie.** — Em generos publicados sem menção nominal de qualquer especie, nenhuma especie é aproveitavel como genotypo, a menos que possa ser reconhecida pela publicação generica original; si apenas uma especie está em jogo, a descripção generica é equivalente á publicação de "*X-us albus, g.n., sp.n.,*"; si varias especies são referidas, mas não mencionadas pelo nome, uma dellas deve ser tomada como typo; si (como em *Aclastus* Foerster, 1868) na publicação original do genero não ha evidencia de quantas especies estão em jogo, esse genero contém todas as especies do mundo que possam caber na descripção generica con-



forme foi publicado originalmente, e a primeira especie publicada em ligação com o genero (como *Aclastus rufipes* Ashmead, 1902) *ipso facto* torna-se typo.

47. *Carcharias, Carcharhinus* e *Carcharodon*. — *Carcharias* Rafinesque, 1810, é monotypico, typo *Carcharias taurus* Rafinesque.

48. **Situação de certos nomes genericos de aves publicados por Brehm in Isis, 1828 e 1830.** — Desde que os nomes de Brehm, 1828 e 1830 dependem exclusivamente de designações vernaculas, elles são *nomina nuda* e não merecem citação.

49. *Siphonophora asclepiadifolii* vs. *Nectarophora asclepiadis*. — Diante dos dados apresentados, *asclepiadifolii* Thomas, 1879, é preferivel a *asclepiadis* Cowen, 1895.

50. *Aphis aquilegiae flava* vs. *Aphis trirhoda*. — Desde que o nome *Aphis aquilegiae flava* Kittell, 1827, é multinominal e inaproveitavel sob o Codigo, *Aphis trirhoda* Walker, 1849, é o nome correcto para esta especie.

51. **Devem acceitar-se os nomes do "Museum Calonnianum", 1797?** — O "Museum Calonnianum", 1797, não é acceitavel como base para qualquer trabalho nomenclatorial.

52. *Semotilus corporalis* vs. *Semotilus bullaris*. — Diante dos argumentos apresentados, *corporalis* tem prioridade sobre *bullaris*. Não é possivel á Commissão exarar uma opinião sobre a pergunta: Que constitue uma descripção adequada? A citação da localidade typo de uma especie não é sufficiente para estabelecer um nome a luz do Art. 25a do Codigo. Si são apresentados caracteres especificos em additamento á localidade typo, esta se torna uma parte da descripção e deve ser considerada como um elemento importante na determinação da identidade da especie.

53. *Halicampus koilomatodon* vs. *Halicampus grayi*. — O nome especifico *grayi* Kaup, 1856, tem prioridade sobre *koilomatodon* Bleeker, "cerca de 1865".

54. *Phoxinus* **Rafinesque vs.** *Phoxinus* **Agassiz**. — Os generos *Dobula, Phoxinus* e *Alburnus* foram creação de Rafinesque 1820. Jordan & Evermann, 1896, allegam que *Phoxinus* Agassiz, 1835, é identico a *Phoxinus* Rafinesque 1820, e, portanto, proclamam ter reconhecido *Phoxinus* 1820. Esta allegação deve ser considerada correcta até que se prove o contrario e *Cyprinus phoxinus* fica como typo de *Phoxinus* 1820 e de *Phoxinus* 1835. Si se allega que *Alburnus* 1820 é identico a *Alburnus* 1840, *Cyprinus alburnus* torna-se typo de *Alburnus* 1820.

55. **Typo do genero** *Ondatra* **Link.** — Diante dos argumentos apresentados, *zibethicus* é o typo de *Ondatra* Link.

56. **Typo de** *Filaria* **Mueller, 1787.** — Mueller (1787, pp. 64 e 70) citou, visivelmente por erro, a mesma gravura (estampa 9, fig. 1) de Redi para *Ascaris renalis* Gmel e *Filaria martis* Gmel.. Gmelin (1790a, pp 3032 e 3040) conservou este lapso. Rudolphi (1809a, p.69) reconheceu e corrigiu o erro e, desde então, *Filaria martis* tem sido consistentemente distinguida de *Ascaris renalis*, não havendo actualmnte motivo para não se reconhecer a correcção do lapso de Mueller por parte de Rudolphi. Assim sendo, *F. martis* fica como typo de *Filaria* e *Filaria* não é mudada para *Dioctophyme, Dioctophyma* ou *Eustrongylus*.

57. **Nomes oriundos do "Iter Palaestinum" de Hasselquist, 1757, e da traducção de 1762, são insustentaveis.** — O "Iter Palaestinum" foi publicado antes de 1758 e editado, em relação á sua nomenclatura, por Linneu. A traducção alemã por Gadebusch, publicada em 1762, não confere validez aos nomes publicados na edição original de 1757.

58. *Esox, Lucius* e *Belone*. — "Considerando-se com severidade", nem Rafinesque (1810, "Caratteri", p.59), nem Cuvier (1817, p.183) designou o typo de *Esox* Linneu, 1758; Jordan & Gilbert, 1882, p.352, escolheram *Esox lucius* Linneu como typo de *Esox*.

59. **Data de** *Amphimerus*. — O nome do trematoide *Amphimerus* Barker não data do apparecimento das separatas («tirés à part»), mas do tempo da publicação dos Studies from the Zoological Laboratory, The University of Nebraska, No. 103.

60. *Salmo iridia* vs. *Salmo irideus*. — *Salmo iridia* é evidentemente um *lapsus calami* ou um erro typographico e pode ser emendado para *Salmo irideus*.

61. **Emenda de** *Chaemepelia* **para** *Chamaepelia*. — A palavra *Chaemepelia* Swainson, 1827, deve ser emendada para *Chamaepelia*.

62. **Especies typo de outros generos não estão excluidas de consideração na selecção do typo de um genero.** — Desde que o Artigo 30 não exclue de consideração as especies typo de outros generos na selecção do typo de um genero dado, as seguintes especies typo, designados por Gray, são, em face dos dados apresentados, os typos validos dos seguintes generos: *Fulmarus*, typo *Procellaria glacialis; Thalasseus*, typo *Sterna cantiaca; Herodias*, typo *Ardea garzetta; Catharista*, typo *Vultur aura; Morphnus*, typo *Falco urubitinga; Helinaia*, typo *Motacilla vermivora*.

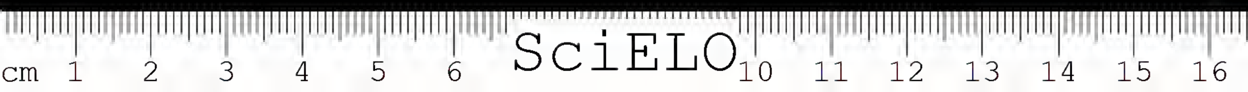
63. *Leuciscus hakuensis* vs. *Leuciscus hakonensis*. — *Leuciscus hakuensis* deve ser correcto para *Leuciscus hakonensis*, em virtude de ter occorrido com o primeiro, seja um *lapsus calami*, seja um erro typographico.

64. **Letras seriadas taes como a, b, c, etc. não são acceitaveis como nomes especificos.** — Letras seriadas como *a, b, c*, etc., não se devem considerar como verdadeiros nomes especificos.

65. **Caso de um genero baseado em especie erroneamente determinada.** — Si um auctor designa uma certa especie como genotypo, deve-se presumir que sua determinação da especie esteja correcta; si se apresenta um caso em que pareça que um auctor baseou o seu genero sobre determinados exemplares, ao invés de o fazer sobre uma especie, seria bom submetter-se o caso, com todos os pormenores, á Commissão. Presentemente é difficil estabelecer-se uma regra geral para taes casos.

66. **Nomes de Nematoideos e Gordiaceos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes de *Nematoda* e *Gordiacea* são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Ancylostoma, Ascaris, Dracunculus, Gnathostoma, Necator, Strongyloides, Trichostrongylus, Gordius*, e *Paragordius*.

67. **Cento e dois nomes de Aves collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os cento e dois nomes seguintes de aves são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Acryllium, Æchmophorus, Ægithina, Ægotheles, Æpyornis, Aix, Alauda, Anas, Apaloderma, Aptenodytes, Apteryx, Aramus, Ardea, Astrapia, Asturina, Aulacorhynchus, Balaeniceps, Batrachostomus, Brotogeris, Bubo, Burhinus, Cairina, Campephaga, Capito, Cathartes, Centrocercus, Cephalopterus, Cereopsis, Chauna, Chrysolophus, Cicinnurus, Circaëtus, Clamator, Coccyzus, Coereba, Colaptes, Colluricincla, Coturnix, Crotophaga, Diomedea, Dromas, Ectopistes, Egretta, Elanus, Eurylaimus, Eurynorhynchus, Eurypyga, Fulmarus, Gallinago, Gampsonyx, Goura, Gypaëtus, Haematopus, Haliaeetus, Haliastur, Heliornis, Ibidorhyncha, Jynx, Lanius, Leistes, Manucodia, Musophaga, Neophron, Notornis, Numida, Nictea, Œdicnemus, Opisthocomus, Oriolus, Pachycephala, Pandion, Parotia, Parus, Pezoporus, Phaëthon, Pharomachrus, Phoenicopterus, Platalea, Platycercus,*



Polyplectron, *Porzana*, *Psittacus*, *Psophia*, *Pteroglossus*, *Ptiloris*, *Rallus*, *Recurvirostra*, *Sericulus*, *Sitta*, *Sphenorynchus*, *Spindalis*, *Strigops*, *Struthio*, *Sturnella*, *Sturnus*, *Surnia*, *Syrrhaptes*, *Tachyphonus*, *Thamnophilus*. *Trichoglossus*, *Uratelornis*, *Vireo*.

68. **Especies typo de *Pleuronectes* Linneu, 1758a.** — Fleming, 1828, 196, não designa o typo de *Pleuronectes*.

69. **Especie typo de *Sparus* Linneu, 1758.** — Fleming, 1828, 211, não designa o typo de *Sparus*.

70. **Caso de *Libellula americana* L., 1758, vs. *Libellula americanus* Drury, 1773.** — Em virtude de ser *Libellula americanus* Drury, 1773 um *lapsus calami* evidente, em logar de *Gryllus americanus*, este lapso deve ser correcto e o nome especifico no caso, *americanus* 1773, não está invalidado por *Libellula americana* 1758.

71. **Interpretação da expressão "especies typicas" na Synopsis de Westwood, 1840.** — As especies citadas por Westwood, 1840 ("An Introduction to the Modern Classification of Insects", Vol 2, Synopsis, paginação separada, pags. 1 a 158), como "especies typicas", devem ser acceitas como designações claras de genotypos para os generos respectivos. Quanto ao facto de uma determinada especie considerada representar ou não o genotypo valido, isto depende de dois factores: *primeiro*, de si a especie era aproveitavel como genotypo; *segundo*, de si a sua designação em 1840 era precedida por qualquer outra denominação.

72. **Formulas zoologicas de Herrera.** — As designações de animaes de accordo com o systema proposto por Herrera, no caso submettido a consideração, são formulas e não nomes. Portanto, ellas não têm valor em nomenclatura e, assim, não estão sujeitas a consideração sob a Lei da Prioridade. Nenhum auctor é obrigado a citar essas designações em qualquer quadro de synonymia, indice ou outras listas de nomes.

73. **Cinco nomes genericos de Crinoideos, oitenta e seis nomes genericos de Crustaceos e oito nomes genericos de Acarinos, collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: CRINOIDEA: *Antedon*, *Bathycrinus*, *Holopus*, *Metacrinus*, *Rhizocrinus*. CRUSTACEA: *Acanthocyclus*, *Actaea*, *Actaeomorpha*, *Actumnus*, *Arcania*, *Archias*, *Arenaeus*, *Atergatis*, *Atergatopsis*, *Banareia*, *Bathynectes*, *Bellia*, *Benthochascon*, *Caphyra*, *Carpilius*, *Carpilodes*, *Carpoporus*, *Carupa*, *Chlorodopsis*, *Coenophthalmus*, *Corystoides*, *Cryptocnemus*, *Cyclodius*, *Cymo*, *Dacryopilumnus*, *Daira*, *Deckenia*, *Domecia*, *Ebalia*, *Epilobocera*, *Epimelus*, *Erimacrus*, *Erimetopus*, *Euphylax*, *Favus*, *Gecarcinucus*, *Hepatella*, *Heterolithadia*, *Heteronucia*, *Heterozius*, *Hydrothelphusa*, *Iliacantha*, *Iphiculus*, *Iphis*, *Ixa*, *Leucosilia*, *Lissocarcinus*, *Lithadia*, *Lupocyclus*, *Merocryptus*, *Myrodes*, *Nucia*, *Nursia*, *Nursilia*, *Onychomorpha*, *Oreophorus*, *Osachila*, *Paracyclois*, *Parathelphusa*, *Parathranites*, *Parilia*, *Pariphiculus*, *Persephona*, *Phlyxia*, *Pirimela*, *Platymera*, *Podophthalmus*, *Polybius*, *Portumnus*, *Potamocarcinus*, *Potamonautes*, *Pseudophilyra*, *Pseudothelphusa*, *Randalia*, *Scylla*, *Speloeophorus*, *Sphaerocarcinus*, *Telmessus*, *Thalamita*, *Thalamitoides*, *Thalamonyx*, *Tlos*, *Trachycarcinus*, *Trichodactylus*, *Trichopeltarion*, *Valdivia*. ACARINA: *Amblyomma*, *Argas*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Rhipicentor*, *Rhipicephalus*.

74. **Lista de Nomina Conservanda de Apstein, 1915.** — A Commissão não tem poderes para adoptar em bloco a lista proposta de Nomina Conservanda de Apstein, mas está prompta a considerar separadamente nomes que lhe forem apresentados com provas razoavelmente completas.

75. **Vinte e sete nomes genericos de Protozoarios, Vermes, Peixes, Repteis e Mammiferos incluidos na Lista Official de Nomes Zoologicos.** — Os vinte e sete nomes genericos seguintes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Zoologicos, com as especies typo dadas no corpo desta Opinião: PROTOZOA: *Volvox*. VERMES: *Hirudo, Lumbricus*. PISCES: *Ammodytes, Anarhichas, Atherina, Fistularia, Mugil, Myxine, Trachinus, Uranoscopus, Xiphias*. REPTILIA: *Draco*. MAMMALIA: *Balaena, Bos, Castor, Delphinus, Erinaceus, Hippopotamus, Hystrix, Monodon, Moschus, Ovis, Phoca, Sus, Talpa, Ursus*.

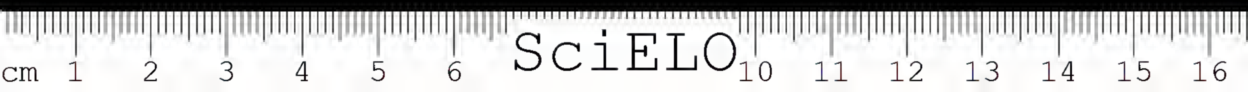
76. **Situação de** *Pyrosoma* **vs.** *Monophora; Cyclosalpa* **vs.** *Holothuria; Salpa* **vs.** *Dagysa; Doliolum, Appendicularia* **e** *Fritillaria*. — O Secretario está auctorizado e aconselhado a insistir sobre o seguinte: — casos apresentados em busca de opinião devem ser acompanhados de dados razoavelmente completos que permittam uma consideração justa dos pontos em jogo. *Pyrosoma* 1804 tem prioridade sobre *Monophora* 1804. *Cyclosalpa* 1827 não é invalidado por *Holothuria* 1758 (typo *physalis*), que, todavia, invalida *Physalia* 1801. O uso actual de *Holothuria* (typo *tubulosa*) em relação a echinodermas não está de accordo com as Regras, mas é aconselhavel que os auctores usem *Physalia* 1801 para o siphonophoro português e *Holothuria* 1791 como genero do "pepino marinho" ("sea cucumber"), até que se resolvam possivelmente suspender as Regras nestes dois casos. Como a apresentação dos casos de *Salpa, Appendicularia, Doliolum* e *Fritillaria* é incompleta e contém erros, estes casos ficam lançados na lista indefinidamente, mas sem juizo formado; as Regras devem ser impostas nestes casos, a menos que fique demonstrado que de sua applicação resulta maior confusão do que uniformidade [Vide Opiniões 77 e 80].

77. **Trinta e cinco nomes genericos de Protozoarios, Celenterados, Trematodeos, Cestoideos, Cirripedios, Tunicados e Peixes collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PROTOZOA: *Arcella*. COELENTERATA: *Hydra*. TREMATODA: *Hemiurus, Schistosoma*. CESTODA: *Anoplocephala, Hymenolepis, Moniezia, Stilesia, Thysanosoma*. CIRRIPEDIA: *Lepas*. TUNICATA: *Pyrosoma*. PISCES: *Acipenser, Callionymus, Chimaera, Clupea, Coryphaena, Cottus, Cyclopterus, Cyprinus, Diodon, Gadus, Gasterosteus, Gobius, Lophius, Mormyrus, Mullus, Muraena, Osmerus, Perca, Salmo, Scomber, Scorpaena, Silurus, Syngnathus, Zeus*.

78. **Caso de** *Dermacentor andersoni* **vs.** *Dermacentor venustus*. — Diante dos argumentos apresentados, a Commissão é de opinião que *Dermacentor venustus* procede de Marx *in* Neumann, 1897, exemplar typo — No. 122 da Collecção Marx (Museu Nacional dos Estados Unidos) colhido de *Ovis aries*, Texas, e que *Dermacentor andersoni* provém de Stiles, 1908, holotypo No. 9467 U.S.P.H. & M.H.S. (Serviço da Saude Publica e do Hospital de Marinha dos Estados Unidos), oriundo de Woodman, Montana.

79. **Caso do "Système des Animaux sans Vertèbres" de Lamarck, 1801a.** — "Considerando-se com severidade", o "Système des Animaux sans Vertèbres" de Lamarck, 1801a, não deve ser acceito como designação de especies typo.

80. **Suspensão das Regras no caso de** *Holothuria* **e** *Physalia*. — Ficam por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos o genero de Echinodermas *Holothuria* Linn., 1767, restr. Bruguière, 1791, typo *H. tremula* 1767= *H. tubulosa* 1790, e o genero de Siphonophoros *Physalia* Lamarck 1801, typo *P. pelagica* 1801= *Holothuria physalis* 1758.



81. **Genotypo de *Cimex*, *Acanthia*, *Clinocoris* e *Klinophilos*.** — Diante dos argumentos apresentados á Commissão, o percevejo commum da Europa, *Cimex lectularius*, é o genotypo de *Cimex* 1758, *Acanthia* 1775, *Clinocoris* 1829 e *Klinophilos* 1899 (*Clinophilus* 1903) e a sua designação technica apropriada sob as Regras é *Cimex lectularius*. *Cimex* Linn., 1758, typo *C. lectularius*, é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos

82. **Suspensão das Regras para *Musca* Linneu, 1758a, typo *M. domestica*** — Por força dos poderes conferidos á Commissão pelo 9° Congresso Internacional de Zoologia para suspender as Regras em qualquer caso determinado, quando, a juizo seu, da applicação restricta das Regras resulte claramente maior confusão do que uniformidade, o Artigo 30 fica aqui suspenso em relação a *Musca* Linneu, 1758; e *Musca domestica* Linneu, 1758, passa a ser designado como typo de *Musca*, sem opinião preformada em relação a outros casos.

83. ***Acanthiza pyrrhopygia* Vigors & Horsfield, 1827, vs. *Acanthiza pyrrhopygia* Gould, 1848.** — A Regra de Homonymos tem por principio que qualquer nome identico, regularmente publicado, de data posterior é "nati-morto e não pode ser revivido". *Acanthiza pyrrhopygia* Vigors & Horsfield, 1827, invalida *Acanthiza pyrrhopygia* Gould, 1848.

84. **Nomes de Trematodeos, Cestoideos e Acantocephalos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: TREMATODA: *Dicrocoelium*, *Fasciola*, *Gastrodiscus*, *Heterophyes*. CESTODA: *Davainea*, *Dipylidium*, *Echinococcus*, *Taenia*. ACANTHOCEPHALA: *Gigantorhynchus*

85. **Noventa e oito nomes genericos de Crustaceos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: CRUSTACEA: *Acmaeopleura*, *Asthenognathus*, *Bathyplax*, *Camptandrium*, *Camptoplax*, *Catoptrus*, *Ceratoplax*, *Chasmagnathus*, *Chasmocarcinus*, *Clistocoeloma*, *Cyrtograpsus*, *Dissodactylus*, *Durckheimia* *Epixanthus*, *Euchirograpsus*, *Eucrate*, *Eucratodes*, *Eucratopsis*, *Euryetisus*, *Euryplax*, *Eurytium*, *Fabia*, *Galene*, *Geryon*, *Glyptograpsus*, *Glyptoplax*, *Gomeza*, *Goneplax*, *Halimede*, *Helice*, *Hephthopelta*, *Hexapus*, *Holometopus*, *Holothuriophilus*, *Homalaspis*, *Lachnopodus*, *Leptodius*, *Liagore*, *Libystes*, *Liomera*, *Lipaesthesius*, *Litocheira*, *Lophopanopeus*, *Lophopilumnus*, *Lybia*, *Melybia*, *Metasesarma*, *Metopocarcinus*, *Micropanope*, *Notonyx*, *Oediplax*, *Ommatocarcinus*, *Opisthopus*, *Orphnoxanthus*, *Panoplax*, *Paragalene*, *Parapanope*, *Parapleirophrycoides*, *Paraxanthus*, *Percnon*, *Perigrapsus*, *Pilumnoides*, *Pilumnus*, *Pinnaxodes*, *Pinnixa*, *Pinnotherelia*, *Pinnotheres*, *Planes*, *Platychirograpsus*, *Platypilumnus*, *Platyxanthus*, *Polydectus*, *Prionoplax*, *Pseudocarcinus*, *Pseudopinnixa*, *Pseudorhombila*, *Psopheticus*, *Ptychognathus*, *Pyxidognathus*, *Rhithropanopeus*, *Rhizopa*, *Ruppellioides*, *Sarmatium*, *Scalopidia*, *Scleroplax*, *Speocarcinus*, *Sphaerozius* *Tetraxanthus*, *Tetrias*, *Thaumastoplax*, *Utica*, *Varuna*, *Xanthasia*, *Xanthodius*, *Xenophthalmodes*, *Xenophthalmus*, *Zosimus*, *Zozymodes*.

86. ***Conulinus* von Martens, 1895.** — O nome generico *Conulinus* von Martens, 1895, toma como typo *Buliminus* (*Conulinus*) *conulus* Rv., e não é necessariamente invalidado pelo nome *Conulina* Bronn.

87. **Situação de paginas de prova em nomenclatura.** — Paginas de prova de impressor não constituem publicação e, portanto, não têm valor debaixo das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica.

88. *Otarion diffractum* vs. *Cyphaspis burmeisteri*. — O nome de uma especie não se desqualifica, simplesmente porque o auctor incluiu em sua concepção partes de corpo de mais de uma especie. O nome de um genero baseado em tal especie é, portanto, aproveitavel. *Otarion diffractum* Zenker é valido. *Atarion* deve ser preferido a *Cyphaspis*; e *C. burmeisteri* Barr. é synonymo de *O. diffractum*.

89. **Suspensão das Regras no caso de Gronow 1763, Commerson 1803, Gesellschaft Schauplatz 1775 a 1781, Catesby 1771, Browne 1789, Valmont de Bomare 1768 a 1775** — Em virtude de Suspensão das Regras em qualquer caso em que tal suspensão possa ser considerada necessaria de accordo com a interpretação adoptada, agora e mais tarde, pela Commissão, declaram-se os seguintes trabalhos ou publicações eliminados de consideração no que concerne aos seus nomes systematicos e segundo as respectivas datas: Gronow 1763, Commerson 1803, Gesellschaft Schauplatz 1775 a 1781, Catesby 1771, Browne 1789, Valmont de Bomare 1768 a 1775.

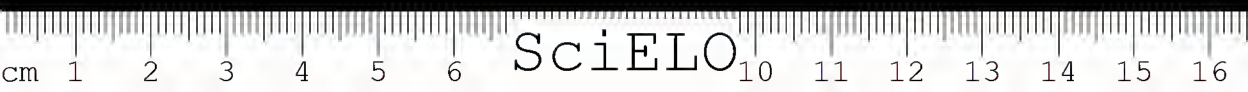
90. **Relatorio sobre dezeseis nomes genericos de Mammiferos para os quaes se solicitou Suspensão das Regras.** — Nenhum dos dezeseis nomes recebeu voto unanime para Suspensão; por consequencia, a Commissão não tem poderes para suspender as Regras em relação a elles. Seis nomes (a saber *Cercopithecus*, *Gazella*, *Hippotragus*, *Lagidium*, *Nycteris* e *Manatus*) receberam a maioria de dois terços ou mais para suspensão e, pois, devem ser levados á decisão final de um comité especial de tres membros, a ser nomeado pelo Presidente da secção de nomenclatura do proximo Congresso Internacional. Dez nomes (a saber: *Echidna*, *Anthropopithecus*, *Coelogenys*, *Chiromys*, *Dasypus*, *Dicotyles*, *Galeopithecus*, *Hapale*, *Rhytina* e *Simia*) deixaram de receber na votação a maioria de dois terços para a suspensão e, pois, a Lei de Prioridade não se applica em taes casos (*).

(*) NOTA DO TRADUCTOR: — Veja-se a respeito a recente monographia publicada pelo Secretario da Commissão Internacional de Nomenclatura Zoologica, Dr. Ch. Wardell Stiles, com a collaboração de M. B. Orleman *in* Hygienic Laboratory Bulletin No 145 (U. S. Public Health Service).

91. **Trinta e cinco nomes genericos de Mammiferos collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Alces*, *Arvicola*, *Ateles*, *Bison*, *Bradypus*, *Canis*, *Capra*, *Cebus*, *Cervus*, *Choloepus*, *Condylura*, *Cricetus*, *Crocidura*, *Cystophora*, *Dasyprocta*, *Didelphis*, *Erethizon*, *Felis*, *Gulo*, *Halichoerus*, *Lepus*, *Lynx*, *Mus*, *Myrmecophaga*, *Nasua*, *Ovibos*, *Phyllostomus*, *Procyon*, *Putorius*, *Rangifer*, *Rhinolophus*, *Rupicapra*, *Sciurus*, *Sorex*, *Vespertilio*.

92. **Dezeseis nomes genericos de Peixes, Amphibios e Repteis collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PISCES: *Blennius*, *Echeneis*, *Esox*, *Ophidion*. AMPHIBIA: *Cryptobranchus*, *Desmognathus*, *Siren*. REPTILIA: *Alligator*, *Calamaria*, *Chelydra*, *Crotalus*, *Dermochelys*, *Erenias*, *Lacerta*, *Mabuya*, *Phrynosoma*.

93. **Doze nomes genericos de Peixes collocados na Lista Official por força de Suspensão das Regras.** — Os seguintes 12 nomes genericos de peixes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos, de accordo com o Poder Plenario para Suspensão das Regras: *Conger* Cuv., 1817 (*Muraena conger* L.); *Coregonus* Linn., 1758 (*Salmo lavaretus* L.); *Eleotris* Bloch & Schneider, 1801 (*gyrinus* Cuv. & Val.); *Epinephelus* Bloch, 1792 (*marginalis* Bloch); *Gymnothorax* Bloch, 1795 (*reticularis* Bloch); *Ma-*



lapterurus Lacépède, 1803) (*Silurus electricus* L.). *Mustelus* Linck, 1790 (*Squalus mustelus* L. [= *Mustelus laevis*]): *Polynemus* Linn., 1758 (*paradisaeus* L.): *Sciaena* Linn., 1758 (*umbra* L. = *Cheilodipterus aquila* Lacép., segundo restr. de Cuvier, 1815): *Serranus* Cuv. (*Perca cabrilla* L.): *Stolephorus* Lacép., 1803 (*commersonianus* Lacép.): *Teuthis* Linn., 1766 (*javus* L.).

Os nomes agora correntes não devem ser abandonados a menos que haja razões indiscutiveis para sua mudança.

94. **Vinte e dois nomes de Molluscos e Tunicados collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: MOLLUSCA: *Anodonta, Argonauta, Buccinum, Calyptraea, Columbella, Dentalium, Helix, Limax, Mactra, Mya, Mytilus, Ostrea, Physa, Sepia, Sphaerium, Succinea, Teredo.* TUNICATA: *Botryllus, Clavelina, Diazona, Distaplia, Molgula.*

95. **Dois nomes genericos de Protozoarios collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos — PROTOZOA: *Endamoeba, Trypanosoma.*

96. **Museum Boltenianum.** — A Commissão acceita o Museum Boltenianum 1798 como sendo aproveitavel do ponto de vista nomenclatorial á luz das Regras Internacionaes.

97. **O "Tentamen" de Hübner, 1806 creou generos monotypicos?** — O Tentamen de Hübner, 1806 foi sem duvida preparado essencialmente como um manuscripto multiplice, ou como uma pagina de prova (Vide Opinião No. 87), para exame e critica por um grupo restricto de peritos, isto é, em *Lepidoptera*, e não para distribuição geral como um registo em zoologia. Por consequencia, é discutivel a conclusão de que foi publicado em 1806. Mesmo que se admitta como premissa sua publicação em 1806, é discutivel que os binomios nelle contidos se devam interpretar como nomes genericos ligados a especificos. Mesmo que se admitta que taes binomios representam combinaçõs de nomes genericos com especificos, elles são essencialmente *nomina nuda* (tendo-se em vista a data que trazem), desde que os auctores, que não possuem informações esotericas a seu respeito, não podem interpretal-os definitivamente sem consultarem a literatura mais recente. Si publicados mais tarde com dados mais positivos, esses nomes passam a ser aproveitaveis na data de sua republicação.

98. **Brauer e Bergenstamm.** — Interpretando-se com rigor, Brauer e Bergenstamm (1889-1894) não fixaram os typos para os nomes genericos mais antigos, excepto nos casos em que affirmam claramente que a especie mencionada é o typo do genero.

99. *Endamoeba* **Leidy, 1879 vs.** *Entamoeba* **Casagrandi & Barbagallo, 1895.** — *Entamoeba* 1895, com *blattae* como typo por designação subsequente (1912), é absolutamente synonyma de *Endamoeba* Leidy, 1879a, p.300, typo *blattae*, e invalida *Entamoeba* 1895, typo por designação subsequente (1913): *hominis=coli*.

100. **Suspensão das Regras para** *Spirifer* **e** *Syringothyris.* — Em virtude de Suspensão das Regras, *Anomia striata* Martin fica estabelecido como genotypo de *Spirifer* Sowerby, 1816, e *Syringothyris typo* Winchell (= *Spirifer carteri* Hall) fica estabelecido como genotypo de *Syringothyris* Winchell, 1863.

101. **Situação nomenclatorial de Danilewsky — "Contribution à l'étude de la microbiose malarique" in Annales de l'Institut Pasteur, 1891, Vol. 5, paginas 758-782.** — As designações technicas latinas, usadas por Danilewsky, 1891, Annales de l'Institut Pasteur, Vol. 5 (12), pp. 758-782, não estão sujeitas a citação sob a Lei de Prioridade, á luz da alludida publicação

102. *Prateocephala* **Blainville, 1828, vs.** *Proteacephalus* **Weinland, 1858.** — Um nome generico (exemplo *Prateocephalus*, 1858) não é invalidado pela publicação anterior de um nome identico ou semelhante de collocação systematica mais elevada (exemplo *Proteacephala*, 1828). Si *Taenia ambigua* (tp. de *Prateocephalus*, 1858) é congenerico de *ocellata* (tp. de *Ichthyataenia*, 1894), *Ichthyataenia* é um synonymo subjectivo de *Proteacephalus*.

103. **O nome generico** *Grus*, **typo** *Ardea grus*. — O typo de *Grus* Pallas, 1767, é *Ardea grus* Linn., 1758, por tautonymia absoluta. *Grus* é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

104. **Cincoenta e sete nomes genericos collocados na Lista Official.** — Os seguintes 57 nomes genericos, com especies typo citadas, são por este modo collocados na Lista Official de Nomes Genericos: PROTOZOA: *Bursaria*, *Eimeria*, *Laverania*, *Plasmodium*, *Sarcocystis*. CESTODA: *Ligula*. NEMATODA: *Filaria*, *Heterodera*, *Rhabditis*, *Strongylus*, *Sarcocystis*. OLIGOCHAETA: *Enchytraeus*. HIRUDINEA: *Haemadipsa*, *Limnatis*. CRUSTACEA: *Armadillidium*, *Astacus*, *Cancer*, *Diaptomus*, *Gammarus*, *Homarus*, *Nephrops*, *Oniscus*, *Pandalus*, *Penaeus*, *Porcellio*. XIPHOSURA: *Limulus*. SCORPIONIDEA: *Scorpio*. ARANEAE ou ARANEIDA: *Avicularia*, *Dendryphantes*, *Dysdera*, *Latrodectus*, *Segestria*. ACARINA: *Cheyletus*, *Chorioptes*, *Demodex*, *Dermanyssus*, *Glyciphagus*, *Polydesmus*, *Psoroptes*, *Rhizoglyphus*, *Trombidium*. THYSANURA: *Lepisma*. COLLEMBOLA: *Podura*. ORTHOPTERA: *Blatta*, *Ectobius*, *Gryllus*, *Periplaneta*. ANOPLURA: *Pediculus*, *Phthirus*. HEMIPTERA: *Anthocoris*, *Nabis*, *Notonecta*, *Reduvius*, *Triatoma*. DERMAPTERA: *Forficula*. SUCTORIA s. SIPHONAPTERA s. APHANIPTERA: *Pulex*. MAMMALIA: *Cercopithecus*.

105. **Nomes de Crustaceos por Dybowski (1926), suppressos.** — Fica resolvido que os novos nomes publicados no trabalho de Dybowski, "Synoptiches Verzeichnis mit kurzer Besprechung der Gattungen und Arten dieser Abteilung der Bakalflohkrebse" (Bul. internat. Acad. polonaise d. Sci. et d. Lettres, 1926, No. 1-2b, jan.-fev., pp. 1-77), são por este meio suppressos, de accordo com Suspensão das Regras, por isso que a applicação das Regras para sua acceitação "resultará evidentemente em maior confusão do que uniformidade".

106. **O typo de** *Oestrus* **Linn., 1758, é** *O. ovis*. — O typo de *Oestrus* Linn., 1758, é *O. ovis* (Art. 30g). A designação de *Oestrus equi* Fabr. por Latreille como typo de *Oestrus* não é valido (Art. 30g). Os 5 seguintes nomes de generos de Dipteros são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos: *Cephenemyia* (typo *trampe*), *Gasterophilus* (typo *equi* de Clark, synonymo de *intestinalis* de Geer), *Hypoderma* (typo *bovis*), *Oedemagena* (typo *tarandi*), e *Oestrus* (typo *ovis*).

107. *Echinocyamus pusillus* **vs.** *Echinocyamus minutus* — O caso de *Echinocyamus pusillus* vs. *Echinocyamus minutus* é objecto de duas interpretações diametralmente oppostas. Baseando-se no principio de que um nome em uso corrente não deve ser supplantado por um anterior mas raramente adoptado, ou por um nome não adoptado, a menos que o argumento seja ambiguo e que as premissas não estejam sujeitas a differenças de opinião, a Commissão, tendo em vista a situação algo incerta de *minutus*, é de Opinião que *pusillus* 1776 não deve ser suppresso por *minutus* 1774

108. **Suspensão das Regras para** *Gazella* **1816.** — De accordo com a Suspensão das Regras, *Gazella* Blainville, 1816, especie typo *Capra dorcas* Linn., 1758a, é adoptado de preferencia a *Oryx*, e por este modo é collocado na Lista Oficial de Nomes Genericos.

109. **Suspensão das Regras para *Hippotragus* 1846.** — De accordo com a Suspensão das Regras (si for preciso), *Hippotragus* Sundevall, 1846, especie typo *Antilope leucophaea* Pallas, 1766, é adoptada de preferencia a *Egocerus* Desmarest, 1822, e a *Ozanna* Reichenbach, 1845 (não *Aegoceros* Pallas, 1811), sendo por este modo collocada na Lista Official de Nomes Genericos.

110. **Suspensão das Regras para *Lagidium* 1833.** — De accordo com a Suspensão das Regras, *Lagidium* Meyen, 1833, especie typo *Lagidium peruanum* Meyen, é adoptado de preferencia a *Viscaccia* Oken, 1816, genotypo "*Lepus chilensis* Molina", e por este modo é collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

111. **Suspensão das Regras para *Nycteris* 1795.** — De accordo com a Suspensão das Regras, *Nycteris* Cuvier & Geoffroy, 1795, especie typo *Vespertilio hispidus* Schreber, 1774, é adoptado de preferencia a *Petalia* Gray, 1838, genotypo *Nycteria javanica* Geoffroy, e e por este modo collocada na Lista Official de Nomes Genericos

112. **Não foi acceita a Suspensão para *Manatus* 1772 vs. *Trichechus* 1758.** — Não foi acceita a Suspensão das Regras para o caso de *Manatus* Brünnich, 1772, especie typo *Trichechus manatus* Linn., 1758a, localidade typo Antilhas, versus *Trichechus* Linn., 1758a, monotypo *T. manatus*; por consequencia, o nome *Trichechus* é applicado ao peixe-boi em vez de à morsa. *Trichechus* Linn., 1758a, typo *T. manatus*, é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

113. ***Sarcoptes* Latreille, 1802, typo *scabiei*, collocado na Lista Official** — *Sarcoptes* Latreille data de 1802, em vez de 1804 ou 1806, como é frequentemente citado. Foi originalmente monotypico, contendo somente *Acarus scabiei*. A designação, feita em 1810, do typo de *Acarus passerinus* é invalida de accordo com o Artigo 30c e 30c *a*. A acceitação de *Acarus scabiei* como especie typo de *Acarus* é invalidada pelo Artigo 30g, donde *Acarus siro* (syn. *farinae*) é o typo de *Acarus*. *Sarcoptes* Latr., 1802, typo *scabiei* é por este modo collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

114. **De accordo com a Suspensão, *Simia*, *Simia satyrus* e *Pithecus* são suppressos.** — De accordo com a Suspensão das Regras, os nomes *Simia*, *Simia satyrus* e *Pithecus* são por este modo suppressos, baseando-se em que sua retenção, de accordo com as Regras, produzirá maior confusão do que uniformidade.

115. **Situação de *Leucochilus*.** — A Commissão supprime *Leucochilus* von Martens, 1881, em favor de *Leucochila* von Martens, 1860, typo *Pupa fallax* Say. Qualquer outra orientação neste ponto traria o risco de gerar confusão duradoura e constante entre dois generos bem affins

116. ***Bulimus* Scopoli, 1777, vs. *Bulinus* Mueller, 1781, vs. *Bulimus* Bruguière, 1792.** — A Commissão não interpreta *Bulimus* Scopoli, 1777, como um obvio erro typographico; os argumentos não mostram que o genotypo (que deve ser escolhido dentre as quatro especies originalmente incluidas) tenha sido definitiva e convenientemente designado. *Bulinus* Mueller, 1781, tem por typo *Bulinus senegalensis* e não está invalidado por *Bulimus*, 1777. *Bulimus* Bruguière, 1792, typo *haemastomus* seu *oblonga*, é um homonymo morto de *Bulimus*, 1777.

117. **Typo de *Lithostrotion*.** — De accordo com a Suspensão das Regras, *Lithostrotion* é por este meio adoptado, com *Lithostrotion striatum* como especie typica, e é collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

118. *Scalpellum gabbi* Wade, 1926, *nomen nudum*. — O nome *Scalpellum gabbi* Wade, 1926 é um *nomen nudum* na data de 1926, desde que seu proprio auctor claramente o tornou dependente de exemplares hypotheticos [Vide Opinião 2].

119. **Seis nomes genericos de Molluscos, collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes seis nomes genericos de MOLLUSCA são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos, com os typos citados: *Cerion* (*uva*), *Oleacina* (*voluta*), *Neritina* (*pulligera*), *Clausilia* (*rugosa*), *Vitrina* (*pellucida*), *Tornatellina* (*clausa*).

120. **Situação de *Achatinus*, 1810.** — *Achatinus*, 1810, representa emenda de *Achatina*, 1799, sendo-lhe, pois, synonymo objectivo; a designação de *zebra* como typo de *Achatinus* contraria o artigo 30*a* e *c*. *Achatinus*, 1810, invalida qualquer uso ulterior de *Achatinus* em sentido differente.

121. **Necessidade não provada da Suspensão das Regras no caso de *Agasoma* Gabb, 1869, typo *sinuatum*.** — Desde que os argumentos apresentados para a Suspensão das Regras no caso de *Agasoma* não convenceram os sete consulentes conchologistas e paleontologistas que estudaram a questão, a Commissão não tem base para approvar a proposta de Suspensão. *Agasoma* Gabb, 1869, typo *sinuatum*, é por este meio collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

122. **Sete nomes genericos de Primatas collocados na Lista Official de Nomes Genericos.** — Os seguintes nomes genericos de PRIMATA são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos, com as especies typo citadas: *Colobus* (*polycomos*), *Galago* (*galago*), *Gorilla* (*gorilla*), *Hylobates* (*lar*), *Lemur* (*catta*), *Pithecia* (*pithecia*), *Tarsius* (*spectrum*).

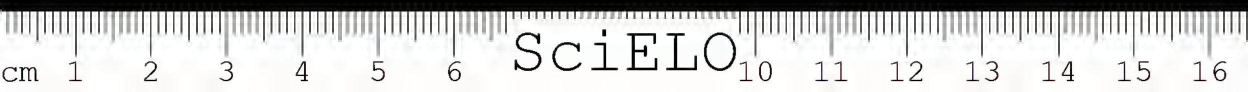
123. **Suppressão de "Onomatologia Historiae Naturalis Completa" de P. F. Gmelin.** — Em vista de causar divergencia de opinião na interpretação de muitos dos nomes usados em Onomatologia Historiae Naturalis Completa de P. F. Gmelin (1758-77), a adopção delles em nomenclatura produziria maior confusão do que uniformidade. Por este motivo, todo esse trabalho (vols. 1 a 7) é por este meio excluido de uso, de accordo com a Suspensão das Regras (si preciso for), á luz das Regras Internacionaes de Nomenclatura Zoologica.

124. **Subdivisões de generos de Linneu, 1758.** — As varias subdivisões de generos publicadas por Linneu em 1758 não são acceitas como possuidoras de valor subgenerico na data referida (1758), á luz das Regras Internacionaes.

125. ***Boros* Herbst, 1797, e *Borus* Agassiz, 1846, vs. *Borus* Albers, 1850.** — *Borus* Agassiz, 1846, representa emenda de *Boros* Herbst, 1797, sendo-lhe, pois, um absoluto synonymo; *Borus* Albers, 1850, é homonymo morto.

126. **Novos nomes em "Prodrome" de d'Orbigny, 1850 são nomenclatorialmente aproveitaveis.** A' luz da evidencia e da opinião de eminentes especialistas consultados, a Commissão não tem base para declarar inaproveitaveis ou como *nomina nuda* os novos nomes apparecidos em "Prodrome" de d'Orbigny, 1850, de accordo com as Regras.

127. **Suspensão das Regras para *Lepidocyclina* Gümbel, 1868, typo *Nummulites mantelli*.** — A' luz da opinião de especialistas, consultados no grupo correspondente, a Commissão por este meio suspende as Regras e colloca *Lepidocyclina* Gümbel, 1868, typo *Nummulites mantelli*, na Lista Official de Nomes Genericos, com *Cyclosiphon* Ehren-



berg, 1856, typo *Nummulites mantelli*, como seu synonymo objectivo. Os consulentes são quasi unanimemente accordes em declarar que a applicação das Regras neste caso produziria maior confusão do que uniformidade.

128. *Nycteribia*, 1796, *Pupipara*, e *Spinturnix*, 1826, *Acarina*. — A' luz da Suspensão das Regras, *Nycteribia* Latreille, 1796, com *pedicularia* Latreille, 1805, como typo, e *Spinturnix* von Heyden, 1826, com *myoti* Kolenati, 1856, como typo, são por este meio collocados na Lista Official de Nomes Genericos.

O nome especifico *vespertilionis* de todos os auctores é por este meio invalidado para os seguintes nomes genericos: *Acarus*, *Acrocholidia*, *Celeripes*, *Dermanyssus*, *Diplostaspis*, *Gamasus*, *Hippobosca*, *Ichoronyssus*, *Liponyssus*, *Listropoda*, *Megistopoda*, *Nycteribia*, *Pediculus*, *Penicillidia*, *Periglischrus*, *Phthiridium*, *Pteroptus*, *Sarcoptes*, *Spinturnix*, *Streblo*, á base de que a applicação das Regras produziria maior confusão do que uniformidade.

129. *Bipinnaria* **1835 vs.** *Luidia* **1839** — As Regras são por este meio suspensas no caso de *Bipinnaria* 1835, vs. *Luidia* 1839, á base de que «da applicação estricta das Regras resultaria indiscutivelmente maior confusão do que uniformidade». *Luidia* Forbes, 1839, com o monotypo *fragilissima* 1839 (synonymo subjectivo de *Luidia ciliaris* 1837), é por este meio collocada na Lista Official de Nomes Genericos. Os nomes *Auricularia*, *Bipinnaria*, *Brachiolaria* e *Pluteus* são por este meio excluidos de aproveitabilidade como nomes genericos e reservados como designações de phases de desenvolvimento.

130. *Lytoceras* **Suess, 1865, collocado na Lista Official de Nomes Genericos.** — A' luz da Suspensão das Regras, *Lytoceras* Suess, 1865 (genotypo, *Ammonites fimbriatus* Sowerby) é por este meio collocado na Lista Official de Nomes Genericos.

131. **Especie typo de** *Tromikosoma* **Mortensen, 1903.** — A especie typo de *Tromikosoma* é *T. koehleri*.

132. **Situação das "Gattungsbezeichnungen" de Sobolew, 1914.** — As "Gattungsbezeichnungen" publicadas por Sobolew, em 1914, são da mesma natureza que as designações publicadas por Herrera, isto e, formulas, e não nomes genericos, não tendo, pois, situação em Nomenclatura [Vide Opinião 72].

133. *Urothoe* **Dana e** *Phoxocephalidae* **Sars.** — A' luz das Regras, o typo de *Urothoe* é *U. rostratus*. O auctor original de um nome de familia tem liberdade de escolher qualquer genero incluso como typo nomenclatorial de tal familia. Não lhe é necessario escolher o mais velho genero incluso como genero typo para essa familia. A' luz dos presentes argumentos, é desnecessario substituir pelo novo nome *Urothoidae* 1932 o mais antigo *Phoxocephalidae*.

(Trabalho da Secção de Ophiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, recebido em novembro de 1937. Dado á publicidade em dezembro de 1937).

595.4381

ALGUNS OPILIÕES DA COLLECÇÃO DO INSTITUTO BUTANTAN

POR

C. DE MELLO-LEITÃO

(Com 9 gravuras no texto)

Recebe o Instituto Butantan, dos pontos mais diversos do Brasil, apreciavel contingente de Arachnideos, especialmente formas cryptozoicas, entre as quaes se encontram especies de *Lycosa* e *Ctenus*, de peçonha activa mesmo para o homem, e que por isso interessam mais de perto a esse Instituto. Com taes aranhas são remettidos com frequencia Opiliões da familia *Gonyleptidae*, que impressionam, assim pelo aspecto extravagante do macho, como pela secreção altamente fétida (quando recente) de suas glandulas cephalothoracicas. Esses "boduns", "aranhas-bodes" ou "frades fedorentos" (designação commum no Rio Grande do Sul, segundo Gliesch) são tidos como venenosos, gozando da mesma infundada fama que os "escorpiões-vinagre" e que os "sólpugos". Essas remessas vão contribuindo para o conhecimento de nossa fauna e não é de estranhar o numero de especies novas em Ordem tão pouco estudada. A região neotropica é terreno quasi inexplorado em todos os grupos de invertebrados e mesmo os territorios que parecem mais conhecidos reservam ainda um rico thesouro de formas ineditas. Um exemplo bastará: a pequena Republica do Panamá teve suas aranhas estudadas por O. e F. Pickard-Cambridge (1886-1903) *in*: Biologia Central Americana e, mais tarde, por Petrunkevitch (1925) que de 280 especies colligidas descreveu 43 novas, e por Banks (1929), que acrescentou mais trinta ainda não conhecidas. Pois bem: em novembro de 1936, Chamberlin e Ivié, numa collecção feita na ilha de Barro Colorado, por Chickering, encontraram mais 69 especies e 4 generos novos.

Os dois generos e as nove especies de Opiliões, que passo a descrever, provêm dos Estados de S. Paulo, Paraná, Santa Catharina e Rio Grande do Sul.



Sub-familia PACHYLINAE

Genero Isopucrolia M.-L.

Isopucrolia tripos, sp. n.

(*Fig.* 1)

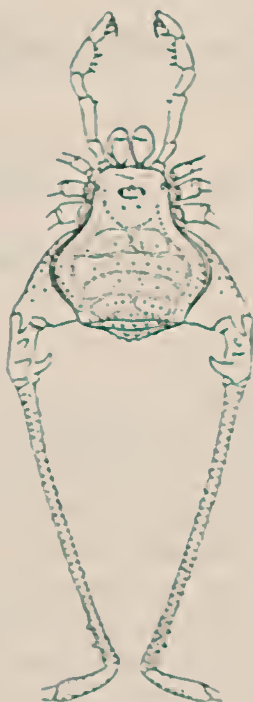


Fig. 1

Isopucrolia tripos, sp. n.

♂ — 8 mm.

Femores: 1,5 — 12 — 8,5 — 19 mm.

Patas: 16 — 40 — 27,5 — 57 mm.

Borda anterior do cephalothorace com dois tuberculos medianos e um de cada lado. Cephalothorace com algumas pequenas granulações atrás do comoro ocular, que é muito rugoso e apresenta um pequeno tuberculo mediano. Escudo abdominal irregularmente granuloso, todas as areas inermes, as areas I e IV divididas por um sulco mediano. Areas lateraes com duas filas de granulos; area V e tergitos livres com uma fila, bem como o operculo anal e os esternitos livres. Area estigmatica rugosa, sem granulações. Ancas IV com alguns granulos; III com uma fila mediana de granulos e uma fila posterior de dentes; II e I com uma fila media de granulos, maiores nas ancas I.

Palpos: trochanter com um espinho; femur com um espinho basilar ventral e outro apicilar interno, mais robusto; patella inerme; tibia com 5 robustos espinhos internos e tres externos; tarso com 3 internos e quatro externos.

Tarsos de 7 — 14 — 9 — 10 segmentos, a porção distal dos tarsos II de quatro segmentos. Femores I e III direitos, IV levemente sinuosos. Patas IV do macho: ancas muito salientes, truncadas, com curta apophyse apicilar externa; trochanter com uma apophyse basilar dorsal e tres apicilares: a superior e a inferior iguaes e a interna muito maior, curva para dentro; femur quasi direito, levemente flexuoso no apice e com pequeno espinho apicilar.

Colorido geral pardo-queimado, sendo o escudo dorsal marmorado de denegrido.

Hab.: Ribeirão Pires, S. Paulo.

Typo: No. 68, na collecção do Instituto Butantan.

Isopucrolia conspersa, sp. n.

(*Fig.* 2)

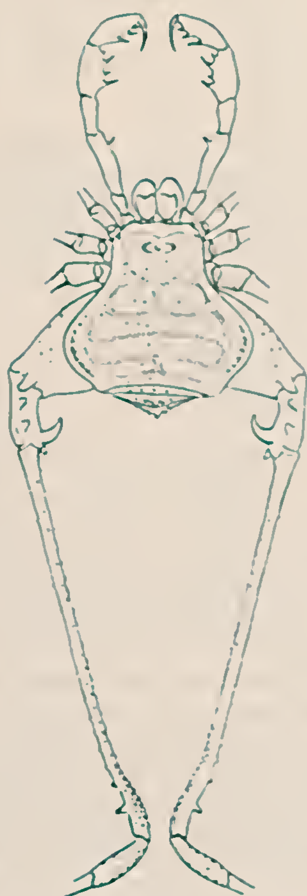


Fig. 2
Isopucrolia conspersa, sp. n.

♂ — 8 mm.

Femores: 4 — 11,7 — 8 — 18,5 mm.

Patas: 15,5 — 41 — 26 — 55 mm.

Borda anterior granulosa. Cephalothorace granuloso. Comoro ocular granuloso, com um cone mediano baixo. Areas I a IV do escudo abdominal inermes e irregularmente granulosas; as areas I e IV divididas por um sulco mediano. Areas lateraes com duas filas de granulações. Area V e tergitos livres com uma fila de granulos pontudos. Operculo anal com uma fila de granulos arredondados e esternitos livres com uma fila de pequeninas granulações. Area estigmatica quasi lisa. Ancas IV granulosas; III com duas filas marginaes de dentes ponteagudos; II e I com uma fila media de granulos grosseiros.

Femores I, II e IV direitos, III curvos em S. Tarsos de 7-11-10-9 segmentos; a porção terminal dos tarsos II (como dos outros) de tres segmentos.

Palpos: trochanter com um espinho; femur com um espinho basilar ventral e outro, mais robusto, apicilar interno, e com uma fila ventral de granulos; patella inerme; tibia com quatro espinhos internos e tres externos; tarsos com tres espinhos de cada lado.

Patas IV do macho: anca granulosa, de apophyse apicilar externa muito curta; trochanter mais longo do que largo, com uma apophyse basilar externa, duas apophyses dorsaes (a interna bem maior, curva) e uma apophyse interna ventral; femur granuloso, livremente dobrado no apice.

Colorido geral castanho queimado. Visto a secco, o corpo apparece densamente pontilhado de secreção branca.

Hab.: Mogy das Cruzes, S. Paulo.

Typo: No. 77, na collecção do Instituto Butantan.

Nota: Podem separar-se as tres especies de *Isopucrolia* pela seguinte chave:

A — Comoro ocular granuloso: as granulações da area V e de todos os tergitos são pontudas . . . . *I. conspersa.*

AA — Comoro ocular liso, as granulações da area V e tergito livre I são arredondadas:

B — Borda anterior com grandes granulações espersas; tergitos livres II e III com granulações pontudas; corpo mosqueado de branco . . . . *I. uniformis.*

BB — Borda anterior apenas com 4 tuberculos; tergitos livres II e III com granulações arredondadas; corpo marmorado de denegrido . . . . *I. tripos.*

Genero. **Pachyloides** Holmb.

Pachyloides taurus, sp. n.

(*Fig.* 3)



Fig. 3
Pachyloides taurus, sp. n.

♀ e ♂ — 7 mm.

Femores do macho: 3,5 — 7 — 6 — 11 mm.

Femores da femea: 3 — 6 — 4,8 — 7 mm.

Patas do macho: 13,5 — 27 — ? — 31 mm.

Patas da femea: 12 — 25 — 17 — 24 mm.

Borda anterior do cephalothorace inerme e lisa. Comoro ocular com dois altissimos espinhos subcontiguos e dois tuberculos atrás dos espinhos.

Cephalothorace com algumas pequenas granulações esparsas. Areas I a IV do escudo abdominal irregularmente granulosas, com granulações maiores e menores. Areas lateraes com duas filas de granulos. Area V com uma fila anterior de granulações maiores e outra posterior, de granulações menores. Tergitos livres com uma fila de grossas granulações. Operculo anal irregularmente granuloso. Esternitos livres com uma fila de pequenos granulos. Area estigmatica lisa. Ancas muito granulosas, com pequenas granulações. Tarsos de 6-10-7-7 segmentos.

Palpos: trochanter com um espinho; femores com um espinho basilar ventral e outro apicilar interno; patella inerme; tibia com 4 espinhos de cada lado e tarso com tres internos e quatro externos.

Patas IV do macho: anca granulosa, com a apophyse apicilar externa pontuda, levemente curva para trás: trochanter mais longo de que largo, com uma notavel apophyse apicilar dorsal, dirigida para dentro e curva em chifre de touro: femur pouco granuloso, dobrado no terço apicilar e com um espinho apicilar interno.

Colorido geral: mogno escuro.

Hab.: Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Typo: No. 78, na collecção do Instituto Butantan.

Nota: Conhecem-se actualmente dez especies de *Pachyloides*, que podemos separar pela chave abaixo:

A — Area I do escudo abdominal apenas com uma fila de granulações:

B — Areas II e III tambem com uma fila de granulos . . . . *P. iheringi* Rwr.

BB — Areas II e III densamente granulosas — *P. thorelli* Holmb.

AA — Area I do escudo abdominal densamente granulosa:

B — Areas I a IV do escudo abdominal com uma fila regular de granulações, bem maiores:

C — Area IV dividida; femur IV do macho curvo em S e com tres pequenos espinhos basilares: tergitos livres com uma fila de granulos; tibias II do macho inermes . . . *P. armatus* Rwr.

CC — Area IV inteira; femur IV do macho curvo regularmente para dentro e tibia III com dois espinhos apicilares:

D — Tergitos livres com uma fila de granulos: apophyse apicilar dorsal do trochanter IV do macho curva para dentro e para trás; cephalothorace apenas com dois tuberculos atrás do comoro ocular . . . . *P. calcartibialis* Rwr.

DD — Tergitos livres com duas filas de granulos; apophyse apicilar dorsal do trochanter IV do macho curva para fora e para diante; cephalothorace densamente granuloso atrás do comoro ocular . . . . *P. fallax* M.-L.

BB — Areas I a IV densa e irregularmente granulosas:

C — Borda anterior do cephalothorace com uma elevação mediana:

D — Femur IV curvo nos dois sexos . . *P. tuberculatus* Muell.

DD — Femur IV direito nos dois sexos . . . *P. fischeri* Muell.

CC — Borda interior do cephalothorace inerme e lisa:

D — Femur IV direito, anca IV lisa, espinhos do comoro ocular baixos . . . . *P. orientalis* Rwr.

DD — Femur IV curvo ou dobrado, anca IV granulosa, espinhos do comoro ocular muito elevados:

E — Femur IV do macho muito curvo, com robustissimo espinho basilar; tibia III do macho com robusto espinho interno; area V com uma fila de granulos . . . . . . *P. bellicosus* RWR.

EE — Femur IV do macho apenas dobrado no terço apicilar e com espinho basilar; tibia III inerme; area V com duas filas de granulações . . . . *P. taurus* M.-L.

Genero **Guaranilia**, g. n.

Comoro ocular com alto espinho. Areas I, II, IV e V do escudo dorsal, tergitos livres e operculo anal inermes; area III com dois espinhos. Femur dos palpos com um espinho apicilar interno. Todos os tarsos de mais de seis segmentos. Este genero é muito proximo de *Guaraniticus*, do qual se distingue por ter todos os tarsos de mais de seis segmentos. Ha 6 generos com dois espinhos na area III, comoro ocular com um espinho e femur dos palpos com espinho apicilar interno e que apenas se separam pela segmentação dos tarsos; são elles:

Eugyndes ROEWER — 4.6.6.6.
Gyndesoides MELLO-LEITÃO — 5.6.5.6.
Klobinia MELLO-LEITÃO — 5.n.5.6.
Oglobinia CANALS — 5.n.6.6.
Guaraniticus MELLO-LEITÃO — 6.n.n.n.
Guaranilia, g.n. — n.n.n.n. Deste o typo é:

Guaranilia nigrosulcata, sp. n.
(Fig. 4)



Fig. 4
Guaranilia nigrosulcata, g. n., sp. n.

♂ — 8 mm.

Femores: 4 — 7 — 6 — 8,5 mm.

Patas: 15,5 — 27 — 20,5 — 28 mm.

Borda anterior inerme e lisa. Cephalothorace liso. Comoro ocular liso com alto espinho mediano, erecto. Areas I a IV do escudo abdominal densamente granulosas, a area III com dois espinhos, area I dividida por um sulco mediano e area IV inteira. Areas lateraes com uma fila de granulações, bem como a area V, os tergitos e esternitos livres. Operculo anal dorsal com algumas granulações esparsas e o ventral com uma fila de granulos. Area estigmatica e ancas densamente granulosas. Femores I e II direitos; II e IV curvos em S. Tarsos de 7 - 13 - 13 - 13 segmentos.

Palpos: trochanter com dois espinhos; femur com dois espinhos basilares ventraes e um apicilar interno; patella inerme; tibia com quatro espinhos de cada lado e tarso com 4 externos e 3 internos.

Patas IV do macho: anca com poucas granulações dorsaes e provida de curta apophyse apicilar externa bifida, transversa, de ramos iguaes, e pequena apophyse apicilar interna dirigida para trás; trochanter mais longo do que largo, com dois espinhos basilares (um dorsal e outro ventral) e tres apophyses: supero-externa (a maior), supero-interna e inferior; femur curvo em S, com filas de granulos na face dorsal, duas filas de dentes na ventral e dois robustos espinhos divergentes no terço e medio.

Colorido geral: castanho queimado, o escudo dorsal com grande mancha esbranquiçada que occupa quasi toda a sua extensão, com os espinhos da area III e os sulcos negros.

Hab.: Sengés, Paraná.

Typo: No. 72, na collecção do Instituto Butantan.

Sub-familia GONYLEPTINAE

Genero **Theliospelta**, g. n.

Comoro ocular com dois espinhos. Ares I, II e IV do escudo abdominal, tergitos livres e operculo anal inermes; area I dividida por um sulco mediano; area III com uma eminencia mamillar mediana. Palpos de femur e patella delgados e inermes. Tarsos I de seis segmentos, os outros de mais de seis.

Este genero se distingue de todos os outros de *Gonyleptinae* pelo curioso tuberculo da area III e pela estructura dos palpos, semelhante á dos palpos de *Goelopyginae;* todavia, suas unhas dos tarsos III e IV são typicamente de *Gonyleptinae*. Typo:

Theliospelta granulata, sp. n.
(*Fig. 5*)

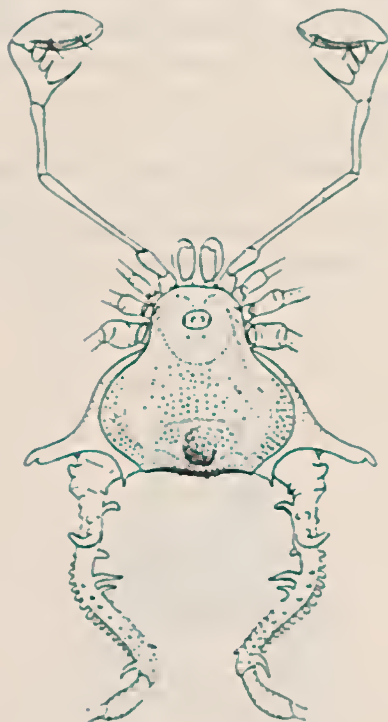


Fig. 5
Theliospelta granulata, g. n, sp. n.

♂ — 7 mm.

Borda anterior lisa e inerme na face dorsal e provida, de cada lado da face anterior, de quatro granulos pontudos dirigidos para diante. Cephalothorace com algumas granulações esparsas. Comoro ocular liso, com dois pequenos espinhos. Areas da região mesotergal irregularmente granulosas, sendo as granulações mais densas na eminencia mamillar da area III. Areas lateraes muito granulosas. Area IV, tergito e operculo anal ventral com uma fila de granulos; operculo anal dorsal liso na porção mediana e granuloso dos lados. Area estigmatica e ancas densamente granulosas.

Palpos: trochanter com uma granulação setifera basilar e duas apicilares; femur delgado, direito, inerme; patella delgada, direita, inerme; tibia muito mais espessa do que a patella e com 4 robustos espinhos de cada lado; tarso da espessura da tibia, com tres espinhos externos e dois internos e com uma dupla fila de numerosos espinhos curtos, triangulares.

Patas 4 do macho: anca granulosa, com robusta apophyse apicilar externa, transversa bifida; trochanter mais longo do que largo, com um espinho externo, sub-basilar e dois apicilares internos geminados e divergentes; fe-

mur curvo em S, com uma apophyse basilar dorsal, uma fila interna de espinhos, dos quaes 4 maiores, e uma fila externa de tuberculos.

Colorido geral amarello-queimado: o cephalothorace fulvo; as granulações do escudo dorsal negras, as da eminencia mamillar avermelhadas; apophyse das ancas IV negras.

Hab.: Inhaiba, S. Paulo.

Typo: No. 67, na collecção do Instituto Butantan.

Genero **Weyhia** Roewer, 1913

Weyhia serriperna, sp. n.

(*Fig.* 6)

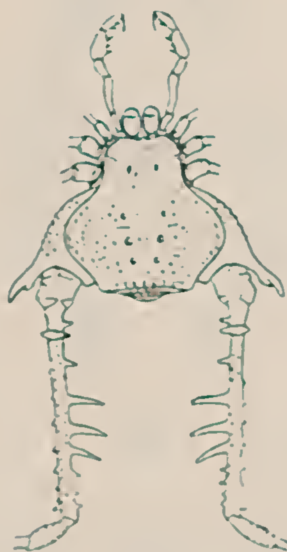


Fig. 6
Weyhia serriperna, sp. n.

♂ — 12 mm.

Femures: 6 — 11 — 10 — 17 mm.

Patas: 23 — 41 — 33,5 — 53 mm.

Borda anterior do cephalothorace com dois tuberculos na eminencia mediana e uma fila de pequenas granulações de cada lado. Comoro ocular com dois tuberculos e algumas granulações. Cephalothorace liso, com dois tuberculos atrás do comoro ocular. Areas I e II do escudo abdominal com algumas granulações espersas e dois tuberculos baixos; area III com duas filas regulares e dois tuberculos mais altos, hemisphericos. Areas lateraes com duas filas de granulos; area IV e tergitos livres com uma fila de granulações pouco numerosas. Operculos anaes lisos. Esternitos livres com uma fila de pequenos granulos. Area estigmatica e ancas densamente granulosas. Tarsos de 6-10-7-8 segmentos.

Palpos: trochanter com um espinho; femur com pequena granulação basilar ventral; patella lisa e inerme; tibia com quatro espinhos internos e tres externos; tarso com dois espinhos principaes de cada lado.

Patas IV do macho: anca granulosa, com robusta apophyse apicilar externa, obliqua, bifida; trochanter mais largo do que comprido, apenas provido de pequenos tuberculos basilares dorsaes; femur direito com uma apophyse incudiforme basilar dorsal e uma fila de robustissimos espinhos na face interna.

Colorido geral: negro uniforme.

Hab.: Porto União, Santa Catharina.

Typo: No. 73, na collecção do Instituto Butantan.

Weyhia granulosa, sp. n.

(*Fig.* 7)

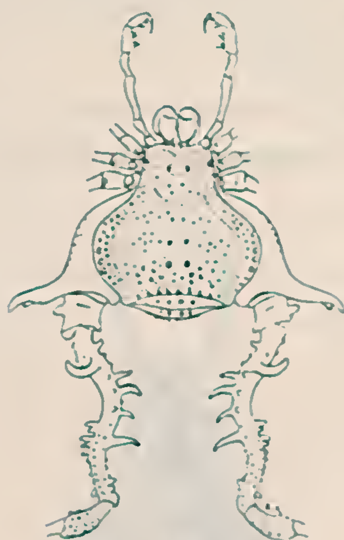


Fig. 7
Weyhia granulosa, sp. n.

♂ — 11,5 mm.

Femores: 5,5 — 9,5 — 8 — 10,5 mm.

Patas: 20 — 34 — 28 — 39 mm.

Borda anterior do cephalothorace com dois espinhos na elevação mediana e uma fila de granulos de cada lado. Cephalothorace com algumas granulações esparsas. Comoro ocular liso, com dois pequenos tuberculos. Areas I a III densamente granulosas e com dois tuberculos baixos e arredondados. Areas lateraes densamente granulosas. Area IV e tergitos livres com duas filas de granulos. Operculo anal dorsal com dois pequeninos tuberculos, o ventral liso. Esternitos livres com uma fila de granulos pequeninos. Area estigmatica e ancas IV com um grande numero de pontos deprimidos, setiferos. Areas III lisas, com uma fila marginal anterior e outra posterior de dentes ponteagudos, as ancas II com uma fila de granulos e anca I com duas.

Tarsos de 6-9-7-8 segmentos.

Palpos: trochanter com dois tuberculos; femur com um tuberculo basilar; patella inerme; tibia com 4 espinhos internos e tres externos; tarsos com dois de cada lado.

Patas IV do macho: anca granulosa, com robusta apophyse apicilar externa, transversa, bifida; trochanter mais largo do que comprido, com uma apophyse conica basilar externa; femur curvo em S, com robusta apophyse dorsal e duas filas de espinhos e dentes, irregularmente dispostos de cada lado.

Colorido geral: castanho denegrido.

Hab.: Pirahy, Paraná.

Typo: No. 69, na collecção do Instituto Butantan.

Nota: Estas duas especies são bem caracterizadas pelos femores IV dos machos. Sua posição entre as demais especies de *Weyhia*, já bem numerosas, será dada em proxima publicação.

Genero **Penygorna** M.-L., 1936

Penygorna bimaculata, sp. n.

(*Fig.* 8)



Fig. 8
Penygorna bimaculata, sp. n.
a — area e tergitos livres, vistos de perfil

♂ — 8 mm.

Femores: 4 — 8,5 — 6,5 — 8,5 mm.

Patas: 14,5 — 28,5 — 21 — 29 mm.

Borda anterior do cephalothorace com duas eminencias e dois espinhos de cada lado. Comoro ocular granuloso, com dois altos espinhos. Cephalothorace densamente granuloso atrás do comoro ocular. Areas I a III densamente granulosas e com dois tuberculos baixos. Areas lateraes com duas filas de granulações. Area IV e tergitos livres com um espinho mediano e uma fila de grossas granulações. Operculo anal granuloso. Esternitos livres com uma fila de granulos. Area estigmatica e ancas muito granulosas. Tarsos de 6-11-7-8 segmentos.

Palpos: trochanter com dois pequeninos turberculos setiferos; femur com uma fila ventral de 4 granulos; patella inerme; tibia com 4 espinhos internos e 3 externos; tarso com 4 espinhos de cada lado.

Patas IV: ancas com curto espinho apicilar externo; trochanter com quatro espinhos internos em fila; femur com duas filas inferiores de espinhos.

Colorido geral: pardo escuro, denegrido; cephalothorace com duas grandes manchas amarellas.

Hab.: Colonia, Rio Grande do Sul.

Typo: No. 71, na collecção do Instituto Butantan.

Sub-familia BOURGUYINAE

Genero Despirus Roewer, 1929

Despirus ustus, sp. n.

(*Fig.* 9)



Fig. 9
Despirus ustus, sp. n.

♂ — 5,5 mm.

Femores: 7 — 14,5 — 9,5 — 19,5 mm.

Patas: 22 — 53 — 30 — 59 mm.

Borda anterior do cephalothorace com uma fila de granulações. Comoro ocular com quatro granulos e dois espinhos obliquamente dirigidos para diante. Cephalothorace com uma area granulosa atrás do comoro ocular. Area I com uma zona media granulosa; II com uma zona media granulosa um pouco mais larga e uma fila de granulos junto ao sulco III; area III com dois espinhos e granulosa nos tres quintos medios; area IV dividida, com uma fila de granulos em seu terço medio. Areas lateraes com uma fila de granulos e duas zonas irregularmente granulosas. Area V e tergitos livres com uma fila de granulações. Operculo anal granuloso. Esternitos livres com uma fila de granulações. Area estigmatica e ancas densamente granulosas, com as granulações setiferas. Tarsos de 6 — 12 — 8 — 7 segmentos.

Palpos: trochanter com um espinho; femur com um espinho basilar e outro apicilar interno; patella inerme; tibia com 4 espinhos de cada lado e tarso com tres. Ancas IV do macho granulosas, com duas apophyses apicilares curvas, quasi iguaes; trochantéres mais longos do que largos, com um espinho sub-basilar interno.

Colorido geral: fulvo, sombreado, com os espinhos negros, bem como as apophyses das ancas IV.

Hab.: Mogy das Cruzes, S. Paulo.

Typo: No. 76, na collecção do Instituto Butantan.

Nota: Enquanto *Despirus parvulus* (Rwr.) tem o aspecto de *Discocyrtus*, e, por isso, alias, foi posto primitivamente nesse genero, *D. ustus* lembra um *Neomitobates*.

(Trabalho de collaboração do Museu Nacional, Rio, recebido para publicação em março de 1937. Dado á publicidade, em separata, em abril de 1937).

591.167:595.11

HERMAPHRODITISMO ALTERNANTE PROTEROGYNICO EM *RHABDIAS FÜLLEBORNI* TRAV.

POR

ANDRÉ DREYFUS

(com 8 figuras)

Rhabdias bufonis (*Angiostomum nigrovenosum*) apresenta um cyclo heterogonico com uma phase parasitaria, no pulmão do sapo ou da rã, e outra livre, no meio exterior. Enquanto que as formas de vida livre são bisexuadas, foi verificado desde 1865 por Leuckart (1) e por Metschnikoff (2) que no pulmão só se encontram femeas. Da inexistencia de machos surgiu a idéa de que o desenvolvimento dos ovulos se désse por parthenogenese, até que o estudo de taes femeas feito por Schneider (3) mostrou que, muito embora fossem esses animaes phenotypicamente femeas incontestaveis (presença de 2 ovarios, 2 uteros, etc.), a analyse de seus ovarios revelou a presença nelles de zonas testiculares. São, pois, hermaphroditas, ou, melhor, femeas transformadas (só em relação á gonada) em hermaphroditas, pois o resto do animal, como dissémos, apresenta caracteres apenas femininos.

O numero de zonas testiculares que se encontra em cada ovario não poude ainda ser esclarecido de modo definitivo. E' muito facil demonstrarmos a existencia de 2 zonas testiculares por ovario, pois nas formas adultas encontramos com grande frequencia uma zona testicular encravada no ovario em situação mais ou menos alta, ao passo que o receptaculo seminal se mostra cheio de espermatozoides. Ora, estes espermatozoides, bem como os utilizados para a fecundação dos numerosos ovos que se encontram em pleno desenvolvimento no utero, só podem ter sido formados por uma zona testicular mais precoce do que aquella que está evolvendo em pleno ovario, mesmo porque nella frequentemente ainda não ha espermatozoides. Como em formas velhas Schleip (4) encontrou zonas testiculares jovens, crê este auctor que talvez se possa formar uma 3.ª zona testicular por ovario. Não discutiremos esta questão, na presente

nota, mesmo porque não interessa ao problema que aqui vamos analysar. O que nos preoccupa é sabermos o que apparece em 1.º logar, si uma zona ovular (hermaphroditismo proterogynico) ou testicular (hermaphroditismo proterandrico).

Tivemos ensejo, trabalhando com *Rhabdias fülleborni* Trav. de observar um animal bastante jovem, cujos uteros continham apenas poucos ovos em segmentação. Basta comparar a Fig. 1, que é um aspecto do conjuncto de exemplar daquella especie, com a Fig. 2, que mostra um *Rhabdias* commum do pulmão, para se poder avaliar com facilidade da juventude de nosso exemplar.

Estudando uma zona testicular admiravelmente nitida apresentada por este animal (Fig. 3) — (para se ter idéa de sua séde, vêr a Fig. 1) — tivemos nossa attenção chamada para uma particularidade que a distingue das zonas testiculares encontradas facilmente nas formas crescidas.

Para que a possamos comprehender, convém que nos detenhamos um pouco na analyse da zona testicular desse *Rhabdias* jovem. Olhemos para a Fig. 4 que nos mostra o limite superior da zona testicular em apreço. Veremos ahi um ovocyto e, abaixo delle, 2 espermatocytos de 1.ª ordem a occupar toda a largura da zona espermatica. Só este facto já é um indicio claro de que tal zona testicular é muito jovem, pois, si a compararmos com o limite superior de uma zona testicular de *Rhabdias* adulto (Fig. 5), veremos que aqui o numero de espermatocytos, que occupam a largura da zona testicular, é de cerca de 10 (tal numero varia, mas é sempre muito superior a 2). Essa região superior da zona testicular, zona de transição de Schleip, nada de especial apresenta, além de sua estreiteza.

O mesmo não occorre, si nos detivermos no exame da zona inferior. Emquanto que, numa zona testicular de *Rhabdias* adulto, vemos um aspecto muito caracteristico, bem estudado por Schleip, que lhe deu o nome de zona de degeneração, aspecto que se pode verificar muito bem em nossa Fig. 5 *a*, o mesmo não aconteceu com a zona testicular jovem. E' assim que, si a examinarmos, veremos ahi os espermatozoides (Fig. 6, *a*) ao contacto de um ovocyto de aspecto absolutamente normal e nenhum signal de degeneração poderá ser observado, apesar de se tratar de zona testicular evolvida, isto é, já tendo elaborado espermatozoides.

Foi tão notavel particularidade que nos levou a examinar com o maximo cuidado os cortes seriados na alludida região. O exame da Fig. 7 mostra-nos que, pouco abaixo da zona testicular que estamos estudando, se podem vêr o *receptaculum seminis* (*b*) e nelle numerosos espermatozoides. E' o que se póde observar com clareza na Fig. 8, I, onde foi cuidadosamente desenhada a zona testicular e, abaixo della, o *receptaculum seminis*, embora, por infelicidade,

uma alça tivesse causado, em nosso corte, a falta de um pedaço do tubo ovarico que vae do ovocyto que fecha a zona testicular (*b*) até o receptaculo (*a*), vendo-se nessa região, onde foi cortado o utero, dois ovos em desenvolvimento. Os cortes seriados mostraram-nos, porém, que nenhum phenomeno degenerativo, como era de se esperar pelo estado do ovocyto *a*, existia no presente caso.

Como explicar tão curiosa differença entre as zonas testiculares de um animal adulto (existencia de uma zona de degeneração) e de um animal jovem (ausencia dessa mesma zona)? O exame dos cortes seguintes, do qual o mais instructivo (que no preparado era o immediato ao figurado em I) está desenhado em II, responde á nossa interrogação. Vemos ahi os espermatozoides (*a*) contornarem o ovocyto que fecha a zona testicular e passar entre os ovocytos para o *receptaculum seminis* (8, II *b*). Somos assim levados á conclusão de que taes espermatozoides vão ser encarregados de fecundar os primeiros ovocytos que, embora nascidos antes delles, só amadurecerão quando já existirem espermatozoides. A necessidade de explicar como se dava a fecundação destes primeiros ovocytos era um dos argumentos em favor da idéa de que a elaboração dos espermatozoides devesse preceder a dos ovulos. O nosso achado explica perfeitamente como se dá tal fecundação.

A opinião, segundo a qual os espermatozoides contidos no receptaculo seminal desse *Rhabdias* jovem puderam ter sido elaborados por uma zona testicular formada anteriormente á que estamos estudando, não nos parece sustentavel: a) por não haver então explicação para a inexistencia da zona de degeneração na zona testicular jovem por nós estudada; b) pelo facto de serem pouco numerosas as zonas testiculares que se formam num ovario de *Rhabdias*. E' assim que, durante toda a vida do animal em geral, só encontramos uma zona testicular por ovario. Tal zona provém de cellulas ovogonicas que, em vez de seguirem a evolução ovogenetica, transformando-se em ovocytos, evolvem differentemente dando espermatocytos. Isto se passa em nivel alto do ovario (zona de synapse) e, á proporção que a zona testicular evolve, desce até que, finalmente, alcança o receptaculo seminal, onde ficam depositados os espermatozoides. Estes espermatozoides fecundarão os ovocytos que forem successivamente amadurecendo.

Como Schleip encontrou em geral uma zona testicular em evolução e espermatozoides (evidentemente formados por uma zona testicular mais antiga) no receptaculo seminal, acreditou que o numero de zonas testiculares deveria ser pelo menos de 2 por ovario. Em animaes muito grandes encontrou uma zona testicular jovem e por isso admittiu que talvez o numero dellas pudesse ser 3. Nossos achados em *Rhabdias fülleborni* são concordes com os de Schleip em *R. bufonis*. Ora, será razoavel que, num animal tão jovem como o que estudamos e onde ha uma zona testicular tão reduzida de tamanho (2 cellulas para toda a largura do testiculo) em relação á mesma zona no adulto, já se tenha

anteriormente formado outra zona testicular, quando acabamos de ver que, durante toda a vida do adulto, onde são postos ovos em numero enorme (ver Fig. 2), uma unica ou no maximo 2 zonas testiculares serão formadas?

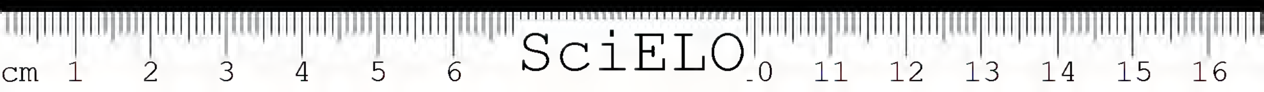
Do exposto pensamos poder chegar á seguinte conclusão: A zona testicular jovem por nós encontrada deve ser, muito provavelmente, a primeira zona testicular formada no *Rhabdias*. Antes de sua formação, o ovario deu nascimento a ovulos cuja fecundação foi assegurada pelo facto de os primeiros espermatozoides, formados depois delles na zona testicular inicial, se terem insinuado entre os ovocytos, situados abaixo e em via de crescimento e, chegados no *receptaculum seminis*, nelles terem penetrado. Assim se explica por que motivo falta, nesta primeira zona testicular, a zona de degeneração. Ao se formar mais tarde uma nova zona testicular, contendo ainda o receptaculo seminal os espermatozoides formados pela primeira zona, permanecem os espermatozoides da segunda zona no local de sua formação e descem ao longo do ovario, simplesmente em consequencia da descida da zona testicular, onde se encontram, sem se insinuarem entre os ovocytos situados abaixo e dos quaes ficam separados pela zona de degeneração. Vemos assim que os espermatozoides da 1.ª zona fecundariam ovulos situados adiante delles e outros mais numerosos, formados depois delles, ao passo que os espermatozoides formados nas seguintes zonas testiculares só poderão fecundar ovocytos nascidos depois delles.

COMMENTARIO

Os auctores que nos precederam no estudo das phases jovens da forma hermaphrodita de *Rhabdiasidae*, foram Schneider (3) e Schleip (4), pois Boveri (5), que estudou o cyclo chromosomico de *Rhabdias bufonis*, não fala nas phases jovens.

Schneider diz textualmente o seguinte: "Infelizmente tambem é mais difficil do que nos hermaphroditas de vida livre ter a certeza de que o ovario no estado mais joven fornece esperma, porque os orgãos sexuaes de *Ascaris nigrovenosa* não se deixam eventrar facilmente, mas ficam ligados solidamente com a parede do abdome. Consegui, porém, encontrar um exemplar que ainda não continha ovos, e sim espermatozoides em estado ainda não desenvolvido, de forma granulosa e situados na parte posterior das tubas" (*). Parece-nos que, si levarmos em conta a precariedade da technica usada por Schneider (trabalho não cytologico), a descripção insufficiente que nos dá e a ausencia de qualquer figura que esclareça as duvidas, em opposição ao aspecto nitido por nós encon-

(*) "Leider ist es auch schwerer als bei den freilebenden Zwitter sich direkt zu uberzeugen, dass der Eierstock in einem früheren Stadium den Samen bereitet, da die Geschlechtsorgane der **Ascaris nigrovenosa** sich nicht leicht herausdrücken lassen, sondern fest mit der Leibeswand zusammenhängen. Indess ist es mir doch gelungen, ein Exemplar zu finden, welches noch keine Eier enthielt, wohl aber Samen in dem noch unentwickelten Stadium als körnige Kugeln, und zwar am Hinterende der Tuben." Loc. cit. in Bibl., p. 317.



trado, deveremos, quando muito, suspender nosso juizo, até que novas observações venham demonstrar si se formam primeiramente ovulos ou espermatozoides na gonada dos *Rhabdiasidae*.

Quanto a Schleip, diz: "No animal mais jovem que me foi dado vêr não encontrei espermatozoides maduros nos receptaculos seminaes e sim uma zona testicular em cada canal germinativo. Numa dellas existem ovos (na direcção do orificio sexual) que se encontram em nitida degeneração. Na outra ha dois ovos em segmentação, de aspecto normal. Como ha espermatozoides maduros em ambos os testiculos, é possivel que alguns delles tenham alcançado os ovos. E' pena que exactamente este preparado estivesse um pouco alterado. Por este motivo não desejaria dar por estabelecido que, conforme se deprehenderia desta observação isolada, se formem de facto, no canal germinativo, primeiramente ovocytos e depois espermatocytos. Mesmo porque isto estaria em opposição á opinião de Schneider acima referida. Espero alcançar resultados definitivos quando se consiga obter estados jovens da geração hermaphrodita por infestação experimental das rãs" (*). E Schleip accrescenta: "Os individuos da geração parasita não merecem, portanto, o nome de hermaphroditas proterandricos, mesmo abstrahindo o facto de se formarem primeiramente ovos, a julgar por uma unica observação. Pelo contrario, elles são em expressão resumida, "hermaphroditas alternantes" que produzem primeiro espermatozoides, depois ovos, em seguida novamente espermatozoides e finalmente, ainda uma vez, ovos. Os ovos formados depois das primeiras cellulas seminaes são fecundados por estas e, quando deste modo os espermatozoides chegam quasi que a ser consumidos inteiramente, avança o segundo contingente de cellulas seminaes entrementes formado acima e torna a encher o receptaculo, permittindo, assim, tambem a fecundação dos ovos situados acima da zona testicular. Não posso dizer com segurança quantas vezes se repete esta formação alternada das duas modalidades de cellulas sexuaes, nem si ha uma terceira formação de espermatozoides, o que dependerá da quantidade de ovos produzidos por um animal" (**).

(*) "In dem jüngsten mir zu Gesicht gekommenen Tier fand ich keine fertigen Spermien in den beiden Samenbehältern, wohl aber eine Hodenzone in jeder Keimröhre. In der einen liegen unterhalb (gegen die Geschlechtsöffnung hin) Eier, die sich deutlich in Degeneration befinden, in dem anderen, zwei sich furchende Eier von normalen Aussehen. Da in den beiden Hodenregionen sich schon fertige Spermien befinden, so ist es möglich, dass einige von diesen zu den Eiern gelangten und diese befruchteten. Leider ist gerade dieses Präparat etwas verletzt. So möchte ich es daher noch nicht für festgestellt ansehen, dass, wie aus dieser einen Beobachtung hervorgehen würde, tatsächlich in der Keimröhre zuerst Ovocyten und dann Spermatocyten gebildet werden; es würde dies auch der oben angeführten Beobachtung von Schneider widersprechen. Endgültige Ergebnisse hoffe ich zu erlangen, wenn es gelungen ist, jugendliche Stadien der zwittrigen Generation durch künstliche Infektion der Frösche heranzuziehen." Loc. cit. in Bibl., p. 98.

(**) "Die Individuen der parasitischen Generation verdienen also den Namen proterandrische Zwitter nicht, auch wenn wir davon absehen, dass, nach einer Beobachtung zu schliessen, überhaupt zuerst Eier gebildet werden; sondern sie ist kurz ausgedrückt, "alternierende Zwitter", welche zuerst Spermien, dann Eier, darauf wieder Spermien und schliesslich nochmals Eier erzeugen. Die nach den ersten Samenzellen gebildeten Eier werden von ersteren befruchtet, und wenn allmählich dadurch die Spermien nahezu aufgebraucht sind, ist der unterdessen oben entstandene zweite Satz von Samenzellen nachgerückt und füllt das Receptaculum wieder auf, damit auch die oberhalb der Hodenzone liegenden Eier befruchtet werden können. Wie oft diese abwechselnde Bildung der beiden Geschlechtszellen sich wiederholt, ob sich überhaupt ein drittes Mal Spermien bilden, kann ich nicht sicher sagen. Es wird das von der Menge der Eier abhängen, welche von einem Tier erzeugt werden." Loc. cit. in Bibl., p. 99.

Fizemos essa longa citação para mostrar as duvidas de Schleip sobre o assumpto que estamos estudando: começa descrevendo uma forma jovem por elle achada e onde se teriam formado primeiramente ovulos, chegando a dizer: "é possivel que alguns delles (espermatozoides) tenham alcançado os ovulos" e os hajam fecundado. E' exactamente nosso ponto de vista. Depois, parece acceitar o ponto de vista de Schneider, declarando que se formam primeiro espermatozoides, depois ovulos, depois espermatozoides e "finalmente", ainda uma vez, ovos. E, depois de ter assim fixado o numero de vezes em que se dá a formação das cellulas sexuaes, diz que não sabe quantas vezes se dá esta alternancia.

Parece-nos, em conclusão razoavel, que devemos conservar a designação de hermaphrodita alternante, proposta por Schleip, a que acrescentaremos proterogynico, para a forma parasita e hermaphrodita de *Rhabdias fülleborni*.

Restaria discutir um ultimo ponto: o hermaphroditismo tão commum entre os nematoides foi sempre descripto como proterandrico. Será o caso do *Rhabdias* uma excepção? E, neste caso, que relações existem entre o hermaphroditismo alternante proterogynico de *Rhabdias* e o hermaphroditismo proterandrico dos demais nematoides? Esta questão, extremamente interessante, será por nós discutida em proximo trabalho.

RESUMO

1 — O encontro de um exemplar bastante jovem da forma parasita e hermaphrodita de *Rhabdias fülleborni*, permittiu estudar bem uma zona testicular.

2 — A zona testicular distinguia-se das zonas testiculares das formas adultas, por não apresentar, no limite inferior, a area de degeneração, que normalmente separa a zona testicular do resto do ovario.

3 — A observação cuidadosa dos cortes seriados mostrou que os espermatozoides formados nesta zona testicular se insinuavam entre os ovocytos situados abaixo e iam para o *receptaculum seminis*, facto que não occorre nas zonas testiculares do adulto.

4 — Desse estudo se pode concluir que, neste animal, primeiramente se formam ovocytos, depois espermatozoides, os quaes descem entre os ovocytos situados adiante delles, indo fecundal-os no *receptaculum seminis*. Assim se explica como, fabricando este animal primeiramente ovulos, podem estes ser fecundados.

5 — Trata-se, portanto, de um animal que fabrica, alternativamente, ovulos e espermatozoides (pelo menos 2 vezes cada) e, por isso, merece ser chamado um hermaphrodita alternante proterogynico.

RÉSUMÉ

En étudiant la forme hermaphrodite et parasite de *Rhabdias fülleborni*, on a rencontré une forme très jeune (Fig. 1) dans laquelle chaque utérus ne contenait que quelques oeufs (à comparer avec la Fig. 2 qui montre l'adulte avec les utérus remplis d'oeufs en évolution). Il s'y trouvait une zone testiculaire particulièrement nette (Fig. 3) qui se distinguait des zones testiculaires des formes adultes (Fig. 5), non seulement à cause d'une moindre épaisseur (2 cellules, Fig. 4, contre environ 10), mais surtout parce que la zone de dégénération (Fig. 5, *a*), qui sépare inférieurement le testicule de l'ovaire, ne s'y trouvait pas (Fig. 6). L'examen des coupes sériées a montré que dans la forme jeune les spermatozoïdes contournaient l'ovocyte qui marque la limite inférieure de l'ovaire, s'insinuaient entre les ovocytes et allaient se tasser dans le *receptaculum seminis* (Fig. 7, *a*), ce que l'on peut voir plus clairement par l'examen du dessin (Fig. 8), qui montre en I *a* le récéptacle rempli de spermatozoïdes. D'où la conclusion suivante: les spermatozoïdes formés dans la première zone testiculaire se chargent non seulement de la fécondation des nombreux oeufs qui viendront terminer leur évolution dans le récéptacle séminal après que la zone testiculaire y soit arrivée (ce qui se passe également pour la deuxième zone testiculaire qui se formera plus tard), mais aussi de ceux qui ont commencé leur évolution avant qu'aie débuté la formation des premiers spermatozoïdes. Il s'ensuit que *Rhabdias fülleborni* est un hermaphrodite alternant proterogynique. On discute ensuite les travaux de Schneider et de Schleip qui ont antérieurement abordé ce problème et on annonce, pour une prochaine publication, un travail où il sera discuté la question de l'hermaphrodisme protérandrique si fréquent chez les nematodes et la relation entre cet hermaphrodisme soi-disant protérandrique et l'hermaphrodisme alternant protérogynique des *Rhabdiasidae*.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei dem Studium des Zwitters und Parasiten *Rhabdias fülleborni* wurde eine sehr junge Form (Fig. 1), bei der jeder Uterus nur einige Eier enthielt, gefunden (Vergleiche mit Fig. 2, die die erwachsene Form zeigt mit dem von Eiern, die sich in der Entwicklung befinden, angefülltem Uterus). Es findet sich hier eine deutliche Hodenzone (Fig. 3), die sich von der der erwachsenen Tiere unterscheidet (Fig. 5), nicht nur auf Grund einer geringeren Grösse (2 Zellen, Fig. 4, gegenüber ungefähr 10), sondern auch hauptsächlich weil sich dort keine Degenerationszone befindet (Fig. 3a), die den Hoden unten von dem Eierstock trennt (Fig. 6).

Eine Untersuchung der Serienschnitte hat gezeigt, dass in der jungen Form die Spermatozoen die Ovocyten umgeben, die die untere Grenze des Ovariums angeben. Sie drängen sich dann zwischen die Ovocyten und sammeln sich im *Receptaculum seminis* (Fig. 7, *a*) an. Das ist deutlich an der Zeichnung Fig. 8 zu sehen, die in I *a* das *Receptaculum* gefüllt mit Spermien zeigt.

Daraus ist folgender Schluss zu ziehen: Die Spermatozoen werden in der 1. Hodenzone gebildet. Sie haben nicht nur die Aufgabe, die zahlreichen Eier zu befruchten, die in das *Receptaculum seminis* gelangen, um dort ihre Entwicklung durchzumachen, nachdem die Hodenzone bis dorthin reichte (was ebenfalls für die zweite Hodenzone, die sich später bildet, gilt), sondern sie müssen auch die Eier befruchten, deren Entwicklung schon begonnen hatte, ehe die ersten Spermatozoen mit ihrer Ausbildung anfingen. Demzufolge ist *Rhabdias fülleborni* ein wechselnd proterogynischer Zwitter.

Dann wurden die Arbeiten von Schneider und Schleip, die früher dieses Problem schon berührt haben, erörtert und für eine nächste Veröffentlichung eine Arbeit angekündigt, worin er die Frage des proterandrischen Hermaphroditismus behandeln will, der so häufig bei den Nematoden vorkommt, und wo er die Beziehung zwischen diesem sog. proterandrichen und dem wechselnd proterogynischen Hermaphroditismus der Rhabdiasidæ darstellen wird.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Leuckart, R.* — *in* Helminthologische Experimentaluntersuchungen, 4. S., Göttingen Nachrichten No.8.1865.
2. *Metschnikoff, E.* — Über die Entwicklung von *Ascaris nigrovenosa*, *in* Arch. f. Anat. u. Physiol. 1865.
3. *Schneider, A.* — Monographie der Nematoden. G. Reimer, Berlim.1866.
4. *Schleip, W.* — Das Verhalten des Chromatins bei *Angiostomum* (*Rhabdonema*) *nigrovenosum*, *in* Arch. f. Zellforschung 7.1911.
5. *Boveri, Th.* — Über das Verhalten der Geschlechtschromosomen bei Hermaphroditismus, *in* Verhandlungen der Phys.-med. Gesellschaft zu Würzburg N. F. 41. 1911.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Todos os cortes provêm de material fixado em Allen, corado pela hematoxylina ferrica. As Microphotos 1, 3, 4, 6, 7 e desenho 8 são de um mesmo *Rhabdias* jovem. As Microphotos 2 e 5 são de *Rhabdias* adulto.

Fig. 1 — Aspecto geral, mostrando a zona testicular (*a*) o receptaculo seminal (*b*) e os 2 uteros (*c*, *d*), cada um com apenas alguns ovos.

Fig. 2 — Aspecto geral de uma forma adulta de *Rhabdias*, mostrando o grande numero de ovos em evolução no utero.

Fig. 3 — Zona testicular de *R.* jovem encravada entre 2 ovocytos. Em *a*, parte superior do testiculo (espermatocytos).
Em *b*, parte inferior (espermatozoides).

Fig. 4 — Limite superior da zona testicular da Fig. 3. Vêem-se, debaixo do ovocyto, 2 espermatocytos de 1.ª ordem (phase diplotena), enchendo toda a largura do tubo espermatico.

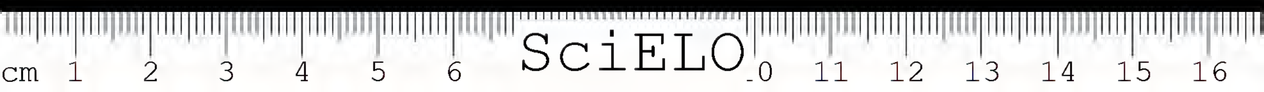
Fig. 5 — Zona testicular de *R. fülleborni* adulto. Em *a*, limite inferior da zona testicular (zona da degeneração). Em *b*, seu limite superior em contacto com ovocytos.

Fig. 6 — Limite inferior da zona testicular da Fig. 3. Em *a*, espermatozoides ao contacto de um ovocyto de aspecto normal (semelhante ao que forma o limite superior da zona testicular. Vide Fig. 3).

Fig. 7 — Zona testicular (*a*) e *receptaculum seminis* (*b*), situados na extremidade posterior do corpo do *Rhabdias*.

Fig. 8 — I. Zona testicular e receptaculo seminal (*a*) cheio de espermatozoides. Na zona testicular vêem-se bem: ovocyto que limita inferiormente a zona testicular (*b*), espermatozoides (*c*), espermatides (*d*), espermatocyto de 2.ª ordem em mitose (*e*), espermatocyto de 1.ª ordem em mitose (*f*) (visto de face), espermatocytos na prophase da 1.ª mitose de maturação (*g*), ovocyto que limita em cima a zona testicular (*h*).
Em II. foi desenhada toda a extremidade inferior do animal. Legenda como em I: intestino contendo sangue digerido (*g*).

(Trabalho de collaboração do Laboratorio de Biologia Geral da Faculdade de Philosophia, Sciencias e Letras da Universidade de S. Paulo, recebido para publicação em julho de 1937. Dado á publicidade, em separata, em agosto de 1937).



Mem. Inst Butantan
Vol. XI — 1937



Fig. 1



Fig. 2

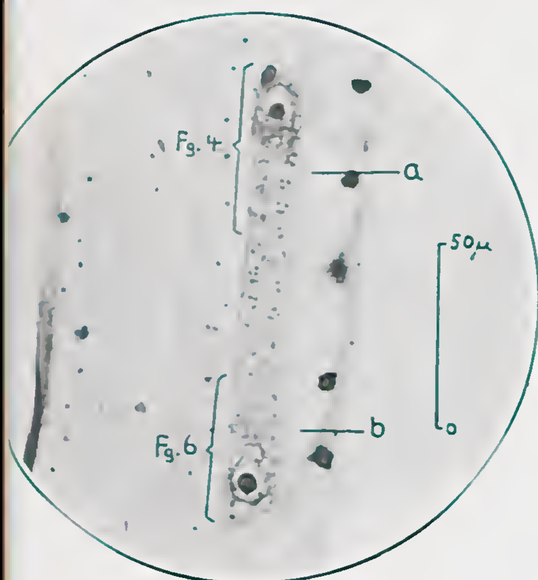


Fig. 3

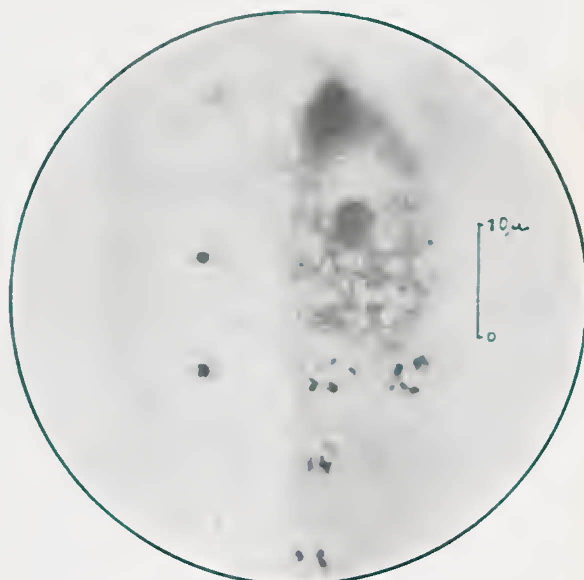
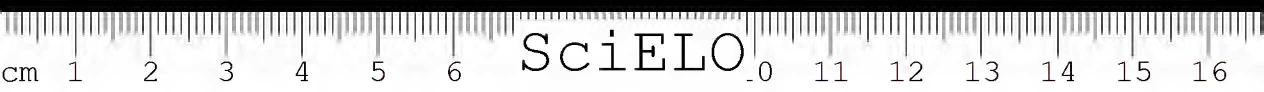


Fig. 4


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

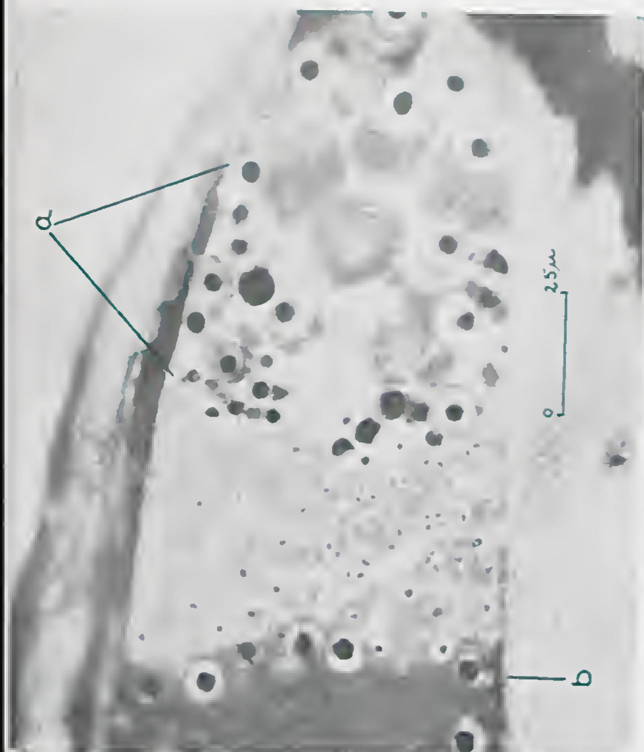


Fig. 5

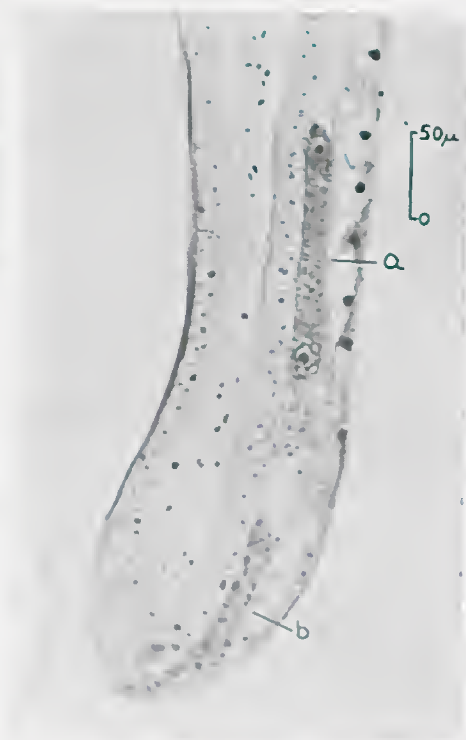


Fig. 7

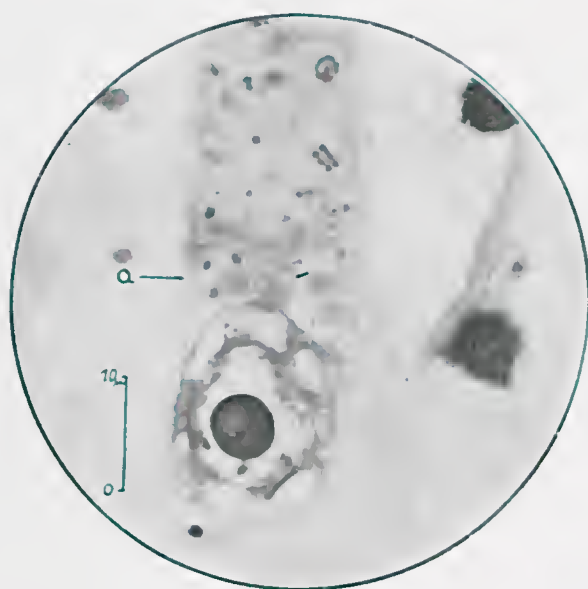


Fig. 6

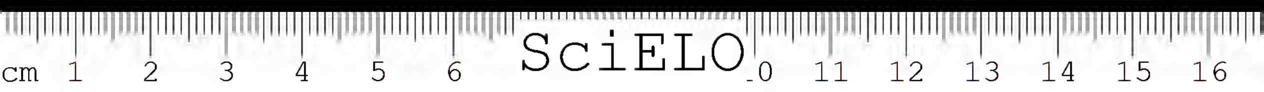
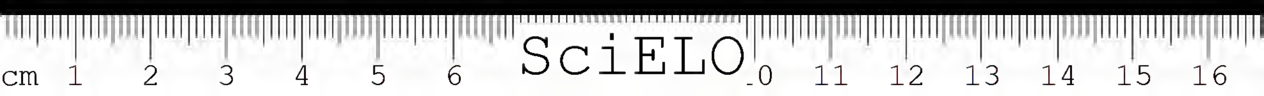

cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16



Fig. 8


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 11 12 13 14 15 16

591.46:597.8

SOBRE A EVOLUÇÃO DE OVOCYTOS CONTIDOS NO TESTICULO DO SAPO

POR

ANDRÉ DREYFUS

(com 15 figuras)

Em nota (1) que acabamos de communicar á Sociedade de Biologia de São Paulo, referimos ter encontrado por 2 vezes em testiculos do sapo *Bufo marinus*, que estavam sendo examinados para outro fim, ovocytos jovens, semelhantes aos que podem ser vistos ao lado no orgão de Bidder. Acreditamos não ser tal facto excepcional, pois dos testiculos por nós examinados (cerca de 80) só eram feitos alguns cortes. E', portanto, possivel que se trate de occorrencia relativamente frequente. Convém, todavia, levar em conta que a quasi totalidade dos cortes dos 2 casos por nós examinados apresentaram ovocytos e, por isso, o facto de só termos observado poucos cortes dos demais testiculos não teria grande importancia. Acreditamos que seria interessante que se fizesse um estudo systematico do assumpto, afim de se esclarecer até que ponto factores raciaes (hereditarios) e mesologicos estão implicados nesse phenomeno.

Revendo cuidadosamente nossos preparados, verificámos, em um dos dois citados casos, aspectos que nos pareceram interessantes e que passamos a referir:

E' assim que encontramos em um typo o cytoplasma cheio de espermatozoides (Fig. 1). Sobre a exacta natureza dessas cellulas basta o exame das varias figuras do presente trabalho para levantar qualquer duvida. Que não se póde tratar de um artefacto é sobejamente demonstrado por: a) integridade no aspecto dos ovocytos, onde se encontram os espermatozoides; b) aspecto normal do corte nas vizinhanças desses ovocytos; c) ausencia de qualquer cellula estranha em muitos outros ovocytos dos mesmos cortes.

Examinámos então, cuidadosamente, todos os cortes seriados e tivemos a opportunidade de vêr alguns outros aspectos interessantes que passamos a relatar:

a) o da Fig. 2. que interpretamos como entrada dos espermatozoides num ovocyto; b) o da Fig. 3. que nos mostra um ovocyto no qual já houve uma penetração mais accentuada do que a observada na Fig. 2: c) o da Fig. 4, que nos mostra, num ovocyto penetrado pelos espermatozoides, o nucleo recalcado para a parte mais extrema do pólo animal do ovocyto, pólo que é a sua séde normal: d) o da Fig. 5, pela qual se vê que, tendo sido penetrado por espermatozoides, um ovocyto foi destruido quasi completamente por elles e rompido, de sorte a só se encontrar um resto do ovocyto sob a forma de crescente. Este aspecto suggere, como acabamos de affirmar, que os espermatozoides, que penetraram no ovocyto, o destruiram, tendo-se, quem sabe, alimentado á custa delle.

Facto estranho, que nos pareceu a principio incomprehensivel, foi encontrarmos, como se vê nas diversas figuras, espermatocytos dentro de ovocytos e ao lado dos espermatozoides. Examinando, porém, os ductos espermaticos em suas porções intra-testiculares, tivemos a explicação desse facto, pois dentro delles tambem podem ser observadas taes cellulas da linhagem seminal, provavelmente desprendidas das empolas seminaes e levadas pelos espermatozoides ao descerem para as vias genitaes. E' o que se vê com clareza nas Figs. 4 e 6. Tal achado explica perfeitamente para nós a presença de cellulas semelhantes dentro do ovocyto. Confirma nosso ponto de vista o exame da Fig. 7, que mostra o ovocyto da Fig. 2, visto com maior augmento e onde se observa que, ao mesmo tempo que os espermatozoides, penetra tambem um espermatocyto. A Fig. 8 mostra um grupo de ovocytos (*a*), dos quaes um unico (*b*) penetrado por espermatozoides; notam-se, nesta microphotographia, os ovocytos do orgão de Bidder (*c*), situados externamente e perfeitamente comparaveis aos que se encontram dentro do testiculo. Nestes ovocytos do orgão de Bidder jamais encontramos espermatozoides e muito menos espermatocytos. Observe-se agora a Fig. 9, que nos mostra, dentro de um ovocyto, entre outras cellulas, dois espermatocytos de 1.ª ordem (*a*, *b*) que, apesar de sua séde (dentro de um ovocyto), ostentam bellas mitoses, o que parece confirmar nosso ponto de vista de ser o ovocyto utilizado como alimento pelas cellulas que nelle entraram. A menos que se prefira admittir que as cellulas da linhagem seminal secretem substancias que lysam o ovocyto, pois o que se não póde pôr em duvida (vide Fig. 5) é que o ovocyto é destruido.

O exame das Figs. 10, 11 e 12 mostra-nos que a destruição dos ovocytos contidos no testiculo tambem se póde dar por mecanismo completamente diverso, isto é, sem penetração de espermatozoides. Vê-se com clareza, na Fig. 10, hernia do nucleo e apparecimento de uma fenda no cytoplasma; na Fig. 11, a membrana nuclear já se apresenta rompida e a fenda cytoplasmatica é maior do que na figura anterior e, finalmente na Fig. 12, o cytoplasma já está completa-

mente scindido em 2 fragmentos. Observa-se em *a* um fragmento do cytoplasma do ovocyto, desfazendo-se em granulos em contacto com espermatocytos synapticos. Não nos foi possivel estabelecer as possiveis relações entre esses espermatocytos e o cytoplasma do ovocyto. A origem dos ovocytos encontrados neste testiculo não poude ser esclarecida sufficientemente. As Figs. 13 e 14 mostram-nos os aspectos mais jovens que encontramos. Já são cellulas de aspecto nitidamente ovocytario, cuja origem nos foi impossivel determinar.

COMMENTARIO

A presença de ovocytos no testiculo do sapo já foi descripta desde muito tempo por varios pesquisadores: Spengel (2), Hoffmann (3), Friedmann (4), Cerutti (5) em sapos europeus e, em sapos americanos, por Miss King (6) no *Bufo lentiginosus*. Nenhum destes auctores encontrou espermatozoides dentro de ovocytos. A unica indicação bibliographica que encontrei de achado que á primeira vista poderia parecer semelhante ao meu, foi uma referencia ao trabalho de E. Knappe, publicado no Morphol. Jahrb. (Das Biddersche Organ. Vol. XI, 1886) que me foi infelizmente impossivel consultar, pois tal revista parece não existir no Brasil e que é aqui citado através de Harms (7).

Falando de transformações que julga de significação secretoria e que podem ser encontrados no orgão de Bidder, diz Harms que a substancia nucleolar se reduz a grãos chromophilos que pódem passar para o cytoplasma sem que se saiba si o fazem intactos ou dissolvidos. Ha uma decomposição a dar elementos em forma de bastonetes que podem ficar em volta do nucleo ou dispersos no cytoplasma e, entre ellas, grãos osmiophilos. E acrescenta: "Diese eigenartigen Stäbchenmassen sind auch von Knappe gesehen worden. Er kommt zu der merkwürdigen Auffassung, dass es sich hier um Spermatozoen handelt, die sich im Bidderschen Organe des Männchens in anormaler Weise bildeten. Welche Bedeutung diese stäbchenartigen Gebilde haben, vermag ich nicht zu sagen. Dass sie nichts mit Spermatozoen zu tun haben, ist wohl selbstverständlich. Sie verschwinden übrigens bei den weiteren Secretionsphasen und sind dann nicht mehr nachzuweisen" (Vol. I, p. 209).

Como se vê do escripto, o achado de Knappe foi no orgão de Bidder e não em ovocytos do testiculo e pelo que diz Harms nada tem que ver com espermatozoides. Repetiremos aqui que nunca observámos espermatozoide algum em ovocytos do orgão de Bidder.

Procurámos tambem a literatura sobre batrachios submettidos a experimentações que conduziam á mudança de sexo ou pelo menos ao apparecimento de ovocytos no testiculo, e tambem não encontrámos referencia alguma á possibilidade de penetrarem espermatozoides nos ovocytos. E' assim que percorremos

os trabalhos de: a) E. Witschi, que estudou (8) o modo pelo qual degeneram os ovocytos na inversão sexual dos gyrinos femeas de *Rana sylvatica* após a applicação de temperatura alta, bem como o desenvolvimento dos machos e dos hermaphroditas rudimentares de *Rana temporaria* e (9) na transformação do ovario em testiculo nelles observada só fala em degeneração de ovocytos; b) de Champy (10), que estudou varios exemplos de transformação de gonada, acreditando numa possibilidade de evolução oviforme de espermatogonias em varios typos de animaes, evolução que seria um primeiro passo no sentido do hermaphroditismo; encontrou tambem uma tal evolução oviforme nos tubos aspermatogenicos de culturas *in-vitro*, bem como em todos os casos em que ha parada da espermatogenese; c) de Guyénot e Ponse, que observaram em testiculo de sapo, enxertados sob a pelle ou no peritonio de sapos machos castrados, uma transformação do testiculo em gonada hermaphrodita com ovogenese fortemente predominante. Os fragmentes no momento de serem transplantados não apresentavam signal de ovocytos. O exame cytologico mostrou mais tarde numerosos ovocytos intracanaliculares: "On peut suivre la transformation directe, semble-t-il, de cellules primordiales, à noyaux lobés en ovocytes; le procédé le plus normal parait être une évolution des spermatogonies, groupées en nids, vers l'aspect caractéristique des ovogonies, puis des ovocytes"; d) de Burns (12), que estudou em larvas parabiosadas de *Amblystoma* a transformação de femeas em machos.

Em nenhum destes casos havia qualquer cousa de comparavel com o que observamos. Como os nossos sapos eram destinados a estudo differente, foram conservados apenas os testiculos incluidos em parafina. Nada sabemos, pois, dos ductos sexuaes, nem dos caracteres sexuaes secundarios. Podemos apenas dizer que o exame summario, a que sempre procedêmos antes de desprezar os animaes, nada de especial nos revelou. Acreditamos que o phenomeno que foi por nós observado provavelmente não ultrapassou a esphera da gonada, nenhuma repercussão tendo tido sobre o resto da genitalia e muito menos sobre os caracteres sexuaes secundarios. Somos levado a tal conclusão, não só por nada de anormal termos observado em nossos animaes, mas ainda pelo facto de achados semelhantes (presença de ovocytos na massa testicular) terem sido feitos sem que os mesmos se tenham acompanhado de qualquer outro symptoma de hermaphroditismo ou intersexualidade. No trabalho acima referido de Guyénot e Ponse está mesmo assignalado que, apesar da "pousée" intensa de ovogenese do testiculo transplantado, a intersticial era normal, bem como os caracteres sexuaes secundarios masculinos.

Considerando, por fim, que os ovocytos por nós encontrados apresentaram evidentes signaes de degeneração, já pela invasão dos espermatozoides, já pelos phenomenos de fragmentação e lyse observaveis nas figuras 10, 11 e 12, parece razoavel concluirmos que o sapo, no qual taes phenomenos se observaram, estava

firmando sua sexualidade masculina, pela perda do unico signal nelle presente de hermaphroditismo, a saber: a presença de ovocytos no testiculo. Adiante veremos observações de Miss King, que tambem estão de accordo com a interpretação que acabamos de dar: phenomeno puramente local (testicular), sem repercussão geral. (Fazemos aqui abstracção do orgão de Bidder, ovario rudimentario presente normalmente em todo sapo).

Evidentemente a penetração de espermatozoides nos ovocytos suggere a idéa de uma fecundação. Acreditamos que aqui em absoluto não se possa pensar nisso. E' verdade que Brachet (13) descreveu a fecundação prematura em ovos de echinodermas. Trata-se, porém, de ovocytos já avançados em sua evolução, onde a vesicula germinativa já se tinha rompido ou se havia dissolvido sua membrana. São, pois, ovocytos nos quaes o cytoplasma já tinha adquirido um certo grau de maturidade, compativel com a penetração dos espermatozoides (polyspermia).

De outro lado, na fecundação prematura, ha notaveis modificações dos espermatozoides penetrados no ovocyto, os quaes desde logo synchronizam sua chromatina á do ovocyto, isto é, transformam sua chromatina de tal forma que ella assume immeditamente o aspecto que no momento caracteriza a chromatina do ovocyto.

Ha, além disso, apparecimento de asteres espermaticos, em relação com cada um dos espermatozoides que penetraram. Nada de semelhante é observavel em nosso caso: Os espermatozoides que em grande numero são encontrados dentro de ovocytos nenhuma modificação estructural de genero dos acima citados apresentam.

Bataillon (14) mostrou a possibilidade da fecundação prematura nos amphibios. O unico dado que poderia approximar o aspecto por nós observado de uma fecundação prematura é o seguinte: na fecundação polyspermica de um ovo maduro de anuro, a penetração dos espermatozoides se dá por toda a superficie do ovo, ao passo que, na fecundação prematura, a entrada dos espermatozoides se dá sómente no pólo superior, e isso por causa de rigidez polar do ovocyto. No nosso caso, a entrada de todos os espermatozoides deu-se num ponto do ovocyto (Fig. 2). Todavia, foi antes para o lado do pólo vitellino. Logo, aqui, só podemos attribuir tal facto a outra causa qualquer (ponto de menor resistencia?), mesmo porque os ovocytos por nós encontrados são demasiadamente jovens para já terem chegado ao periodo em que se estabelece a rigidez polar, causa da penetração pelo pólo animal. Estamos aqui diante de ovocytos extremamente jovens, onde ainda não começou a elaboração do vitello e nos quaes, portanto, a chamada "maturidade cytoplasmatica", indispensavel á penetração dos espermatozoides, absolutamente ainda não se estabeleceu. E' sabido que, salvo raras excepções (*Dinophilus apatris*, *Fasciola hepatica*, varios

Turbellarios, etc.), a entrada do espermatozoide só é possivel no ovocyto que chegou ao termo do desenvolvimento, com o vitello já perfeitamente formado. Cremos, por isso, que a nossa interpretação, de que a penetração dos espermatozoides é seguida de destruição do ovocyto que seria utilizado como alimento pelos espermatozoides e demais cellulas da linhagem seminal com elles penetrados, é a mais razoavel.

Quanto á origem dos ovocytos que aqui estamos descrevendo, não foi possivel por meio de nossos preparados estabelecel-a com segurança. Os ovocytos mais jovens que encontrámos (Figs. 13 e 14) já tinham, como foi dito acima, aspecto nitidamente ovocytario. King, no trabalho acima citado, acredita que: "It is highly improbable that these cells originate in Bidder's organ and subsequently migrate into the sex-gland, as there is never any opening between these structures"; e ainda "I am strongly inclined to the opinion that these cells are primordial germ-cells in which, for some unknown reason, the course of development has been changed so that the cells increase in size with unusual rapidity and assume the characteristics of rudimentary ova. Cells of this kind must, therefore, be considered as degenerating cells. Their presence in the sex-gland is apparently not harmful to the individual, since none of the young toads in which they are found seem to differ in any other way from the normal type" (p. 163). Guyénot e Ponse acreditam, como vimos, que os ovocytos testiculares derivam das cellulas germinativas primordiaes com nucleo lobado, opinião que tambem é defendida por Champy. A Fig. 15 mostra-nos, lado a lado, uma cellula primordial com nucleo lobado (*a*), um ovocyto muito joven (*b*) e outro mais crescido (*c*). Não ousamos, porém, sobre tal fundamento affirmar que de cellulas semelhantes á espermatogonia-mãe que aqui vemos (cellula um nucleo lobado) derivaram os ovocytos.

RESUMO

1 — Em 2 testiculos de sapo (em cerca de 80 examinados) foram encontrados ovocytos em plena massa testicular (Figs. 1, 3 e 4).

2 — Em alguns desses ovocytos havia espermatozoides numerosos e alguns espermatocytos (Figs. 1, 3, 4 e, particularmente, 9).

3 — Os espermatozoides parece haverem penetrado activamente nesses ovocytos, levando consigo os espermatocytos (Figs. 2 e 7), pois nas vias espermaticas é possivel ver, entre os espermatozoides, alguns espermatocytos (Fig. 6).

4 — Os espermatozoides parece haverem devorado o ovocyto, pois se encontraram restos de ovocytos que haviam sido destruidos pelos espermatozoides (Fig. 5).

5 — Nos ovocytos do orgão de Bidder, não foram encontrados espermatozoides (Fig. 8).

6 — As cellulas mais jovens da serie ovular encontradas já eram ovocytos (Figs. 13 e 14), não se podendo affirmar que os ovocytos derivassem de espermatogonias-mães (Fig. 15).

7 — Além da destruição dos ovocytos por phagocytose espermatozoidica, foi encontrada uma degeneração ovocytaria consistindo em hernia do nucleo (Fig. 10), ruptura da membrana nuclear (Fig. 11) e fragmentação do cytoplasma (Figs. 10, 11 e 12).

RÉSUMÉ

On a rencontré par deux fois, sur un total d'environ 80 testicules du crapaud *Bufo marinus*, examinés dans un autre but, des ovocytes en pleine masse testiculaire (1). En examinant plus attentivement les préparations, on a vu, dans un de ces deux cas, des spermatozoïdes en grand nombre, à l'intérieur de certains ovocytes (Figs. 1, 3, 4). Dans un certain nombre de ces ovocytes on y avait non seulement de nombreux spermatozoïdes, mais aussi des spermatocytes (Figs. 1, 3, 4 et spécialement 9 où l'on voit des mitoses spermatocytaires). Les spermatozoïdes ont probablement pénétré activement dans ces ovocytes en transportant avec eux spermatocytes, c'est ce que l'on peut voir à la Fig. 2 (pénétration des spermatozoïdes) et, avec un plus fort grossissement, à la Fig. 7 (pénétration des spermatocytes et des spermatozoïdes). L'hypothèse qui vient d'être faite est fortement soutenue par l'observation de la Fig. 6 qui nous montre que, normalement, dans les voies séminales intratesticulaires, l'on peut également voir des spermatocytes entre les spermatozoïdes. On admet que, peut-être, les spermatozoïdes se nourrissent aux dépens de l'ovocyte, les spermatocytes (mitoses) agissant de même. Ceci se justifie par l'examen de la Fig. 5 qui montre un reste d'ovocyte détruit par des spermatozoïdes. En plus de cette forme de destruction des ovocytes une autre a été rencontrée. Il s'agit d'hernie nucléaire (Fig. 10), rupture de la membrane nucléaire (Fig. 11), et fragmentation du cytoplasme (Figs. 10, 11, 12).

En examinant l'organe de Bidder, on n'y a jamais vu de phénomènes de ce genre. La Fig. 8 montre cet organe avec son aspect habituel et d'autre part à l'intérieur du testicule, un certain nombre d'ovocytes dont un, pénétré par des spermatozoïdes. Sur l'origine de ces ovocytes on ne peut rien avancer. L'examen de la Fig. 15 montre un gros ovocyte, un plus petit et une spermatogonie-mère à noyau lobé. Il y a-t-il une filiation à établir entre ces spermatogonies et les ovocytes?

* * *

On analyse ensuite des cas semblables, où l'on a rencontré des ovocytes dans la masse testiculaire de crapaud, mais jamais la pénétration de spermatozoïdes dans les ovocytes: Spengel (2), Hoffmann (3), Friedmann (4), Cerutti (5), Miss King (6). Harms (7) cite une trouvaille de Knappe qui aurait vu des éléments à forme de spermatozoïde dans les ovocytes de l'organe de Bidder. On n'a pas pu se procurer ce travail, mais étant donné la critique de Harms qui ne croit pas à ces soi-disant spermatozoïdes et le fait que cette observation a été faite sur l'organe de Bidder, il est fort probable qu'il n'y ait rien de commun entre les observations de Knappe et celles que l'on décrit ici. On analyse ensuite d'autres travaux d'ordre expérimental: Witschi (8 et 9), Champy (10) Guyénot et Ponse (11), Burns (12). Il n'y est fait aucune référence à la possibilité d'une pénétration de spermatozoïdes dans des ovocytes. On discute ensuite la question de la fécondation prématurée pour arriver à la conclusion qu'il ne peut pas s'agir ici d'un tel phénomène (les spermatozoïdes qui pénètrent les ovocytes ne montrent aucune modification de leur structure, absence d'asters spermatiques, absence de maturation cytoplasmique de l'ovocyte, indispensable à cette maturation, etc..

Comme les animaux étaient étudiés dans un autre but, on n'y a pas fait l'examen attentif des conduits génitaux, mais à peine un examen sommaire. Étant donné que les ovocytes étaient en voie de destruction, il est fort probable, comme Miss King l'a vu chez *Bufo lontiginosus*, que le phénomène ici rapporté soit localisé au testicule qui, par la destruction des ovocytes y contenus, était en voie d'affirmer définitivement sa condition masculine.

ZUSAMMENFASSUNG

Man traf zweimal, bei im Ganzen ungefähr 80 Hoden der Kröte *Bufo marinus*, die zu einem anderen Zweck untersucht wurden, auf Ovocyten, die mitten in der Hodenmasse lagen. Bei genaueren Untersuchungen der Präparate, wurde in einem der beiden Fälle eine grosse Anzahl Spermien gesehen, die sich innerhalb einiger Ovocyten befanden (Figs. 1, 3, 4). In einigen dieser Ovocyten fand man nicht nur zahlreiche Spermatozoen, sondern auch Spermatocyten (Figs. 1, 3, 4 und besonders 9, wo man Spermatocytenmitosen sieht). Die Spermatozoen sind wahrscheinlich in diese Ovocyten eingedrungen, wobei sie die Spermatocyten mit sich brachten. Dies kann man in Fig. 2 sehen (Eindringen der Spermatozoen) und mit stärkerer Vergrösserung in Fig. 7 (Eindringen von Spermatozoen und Spermatocyten). Die eben aufgestellte Hypothese wird stark unterstützt durch die Beobachtung an Fig. 6, wo man sieht, dass normaler Weise in den intratesticularen Samenkanälen sich ebenfalls Spermatocyten zwischen Spermatozoen finden. Es wurde hinzugefügt, dass die Spermatozoen



sich wohl auf Kosten der Ovocyten ernähren, ebenso die Spermatocyten (Mitosen). Das wird gerechtfertigt durch Fig. 5, die uns den Rest einer von Spermatozoen zerstörten Ovocyte zeigt. Ausser dieser Form von Zerstörung der Ovocyten beobachtete man noch anderes. Es handelt sich um eine bruchsackartige Kernvorwölbung (Fig. 10), einen Bruch der Kernmembran (Fig. 11), und Zerfall des Cytoplasmas (Fig. 10, 11, 12).

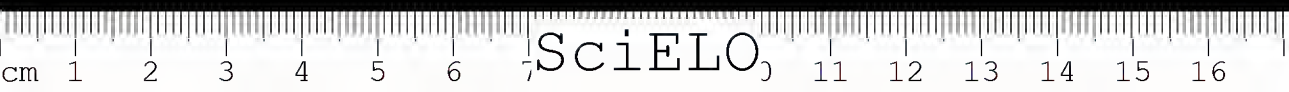
Eine Untersuchung des Bidderschen Organs zeigte niemals einen derartigen Sachverhalt. Fig. 8 bringt dieses Organ in seinem gewöhnlichen Aussehen und andrerseits im Innern des Hodens eine Anzahl von Ovocyten, von denen eine von Spermien durchdrungen ist. Über den Ursprung dieser Ovocyten ist noch nichts vorzubringen. Die Untersuchung von Fig. 15 zeigt uns eine dicke Ovocyte, eine kleinere und eine Spermatogonie mit gelappten Kern. Ob sich vielleicht die Spermatogonien zu Ovocyten verwandeln?

* * *

Es wurden dann die Fälle, in denen Ovocyten in den Hoden der Kröte gefunden wurden, die aber niemals von einem Eindringen von Spermatozoen in Ovocyten berichten, behandelt: Spengel (2), Hoffmann (3), Friedmann (4), Cerrutti (5), Miss King (6).

Harms (7) erwähnt eine Beobachtung von Knappe, der in den Ovocyten des Bidderschen Organs Elemente in Form von Spermatozoen gesehen haben will. Die Arbeit war nicht verschaffbar, aber da die Kritik bei Harms, der an diese sogenannten Spermatozoen nicht glaubt, gegeben ist, geht hervor, dass diese Beobachtung am Bidderschen Organ gemacht wurde und es besteht die Wahrscheinlichkeit, dass keinerlei Gemeinsamkeit zwischen den von Knappe gemachten Feststellungen und den hier beschriebenen besteht. Dann wurden die anderen Abeiten experimentellen Inhalts besprochen: Witschi (8 u. 9), Champy (10). Guyénot u. Ponse (11), Burns (12). Nirgends wurde eine Bezugnahme auf die Möglichkeit eines Eindringens von Spermatozoen in Ovocyten gefunden. Es wird darauf die Frage der vorzeitigen Befruchtung erörtert, woraus sich ergeben hat, dass es sich hier nicht um einen derartigen Vorgang handeln kann. (Die Spermatozoen, die in die Ovocyten eindringen, zeigen keinerlei Veränderung des Baus, es fehlen Asteren der Spermien usw.).

Da die Tiere zu einem anderen Zweck untersucht worden sind, hat man ihrem geschlechtlichen Verhalten keine besondere Aufmerkasamkeit gewidmet, sondern nur eine summarische Untersuchung vorgenommen. Da die Ovocyten auf dem Wege der Zerstörung waren, ist sehr wohl möglich, dass, was Miss King bei *Bufo lentiginosus* gesehen hat, dieser Tatbestand, mit dem wir uns



beschäftigten, auf den Hoden lokalisiert ist und durch die Zerstörung der sich dort befindenden Ovocyten endgültig hiermit die männliche Bestimmung erreicht ist.

BIBLIOGRAPHIA

1. *Dreyfus, A.* — Sobre a occurrencia de ovocytos no testiculo do sapo *Bufo marinus*. Revista de Biologia e Hygiene 8.1937.
2. *Spengel, J. W.* — Das Urogenitalsystem der Amphibien. Arbeit d. zoolog-zootom. Inst. Würzburg 3. 1870.
3. *Hoffmann, C. K.* — Entwicklungsgeschichte der Urogenilorgane bei den Anamisia Zeitschr. wiss. Zoologie 44. 1886.
4. *Friedmann, F.* — Rudimentäre Eier in Hoden von *Rana viridis*. Arch. mikr. Anat. 52. 1898.
5. *Cerutti (A.)* — Sopra due casi di anomalia dell'apparato reproduttore nel *Bufo vulgaris* Lam. Anat. Anz. 30. 1907.
6. *King, H. D.* — Some anomalies in the genital organs of *Bufo lentiginosus* and their problable signfiicance. Am. Journ. of Anatomy 10. 1910.
7. *Harms, J. W.* — Körper und Keimzellen, Vol. I. Springer, Berlin.1926.
8. *Witschi, E.* — Studies on sex-differentiatiòn and sex determination in Amphibiens II. Journ. of Exp. Zool. 52. 1929.
9. *Witschi, E.* — Idem III. Journal of Exp. Zool. 54. 1929.
10. *Champy, Ch.* — Caractères sexuels et Hormone, Doin, Paris.1924.
11. *Gyénot, E. et Ponse, K.* — Inversion experimentale du type sexuel dans la gonade du crapaud. C. R. Soc. Biol. 89. 1923.
12. *Burns, R. K. Junior* — The process of sex transformation in parabiotic Amblystoma 1. Transformation from female to male. Journ. of. Exp. Zool. 55. 1930.
13. *Brachet, A.* — L'oeuf et les facteurs de l'ontogénèse — 2ième. ed. Doin, Paris.1931.
14. *Bataillon, E.* — Études cytologiques et expérimentales sur les oeufs immatures de Batraciens. Arch. f. Entwickl. — 117. 1929.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — Um ovocyto em cujo interior ha numerosos espermatozoides e alguns espermatocytos.

2 — Um ovocyto no qual se vê o inicio da penetração dos espermatozoides dentro do cytoplasma do ovocyto, o nucleo vitellino fragmentado.

3 — Um ovocyto, do qual approximadamente metade penetrada por espermatozoides e espermatocytos.

4 — Ovocyto com o nucleo fortemente deslocado para um dos pólos da cellula, cytoplasma invadido por cellulas sexuaes masculinas. Ao lado do ovocyto, um vaso e, ao lado deste, um ducto espermatico intratesticular(visto com maior augmento na Fig. 6) e outro abaixo do ovocyto.

5 — Empola seminal contendo 2 ovocytos jovens (num delles, o nucleo foi attingido pelo corte) e um crescente (*a*), ultimo vestigio de ovocyto destruido por cellulas da linhagem seminal situadas acima do crescente.

6 — Corte de um ducto seminal intratesticular da Fig. 4. Na luz do ducto vêem-se espermatozoides e espermatocytos.

7 — Forte augmento da zona da penetração dos espermatozoides da Fig. 2, mostrando, ao lado dos espermatozoides espermatocytos (*a*), penetrando no ovocyto.

8 — Aspecto de conjuncto, mostrando a massa testicular, contendo ovocytos (*a*), dos quaes 1 penetrado por espermatozoides (*b*). Ao lado do testiculo, fragmento do orgão de Bidder (*c*).

9 — Ovocyto, contendo cellulas da linhagem seminal. Em *a* e *b*, 2 espermatocytos de 1.ª ordem em mitose.

10 — Ovocyto, mostrando hernia do nucleo e fenda no cytoplasma.

11 — Ovocyto, mostrando nucleo herniado e com membrana nuclear rompida e fenda no cytoplasma.

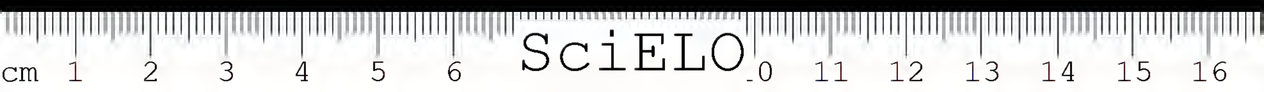
12 — Ovocyto mostrando, além de hernia nuclear, fragmentação do cytoplasma em 2 blocos. Em *a* residuo do cytoplasma, desfazendo-se em granulos e em relação com espermatocytos synapticos.

13 — 2 ovocytos jovens no interior de uma empola seminal.

14 — Empola seminal, contendo 1 ovocyto jovem.

15 — Lado a lado: uma espermatogonia-mãe (*a*), um ovocyto jovem (*b*) e outro mais crescido (*c*).

(Trabalho de collaboração do Laboratorio de Biologia Geral da Faculdade de Philosophia, Sciencias e Letras da Universidade de S. Paulo para publicação em julho de 1937. Dado á publicidade, em separata, em agosto de 1937).


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937

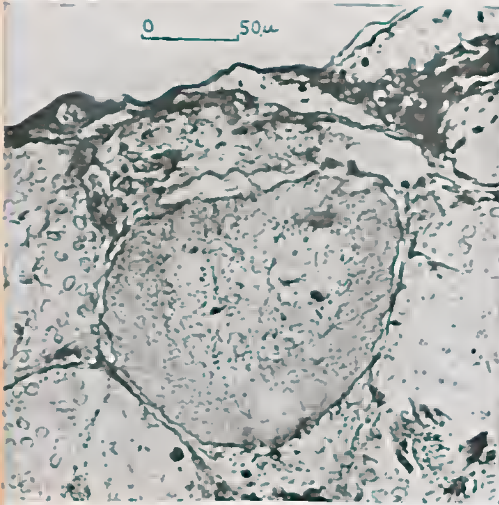


Fig. 1

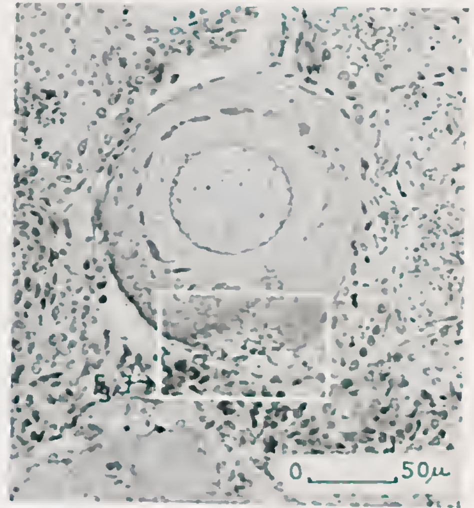


Fig. 2

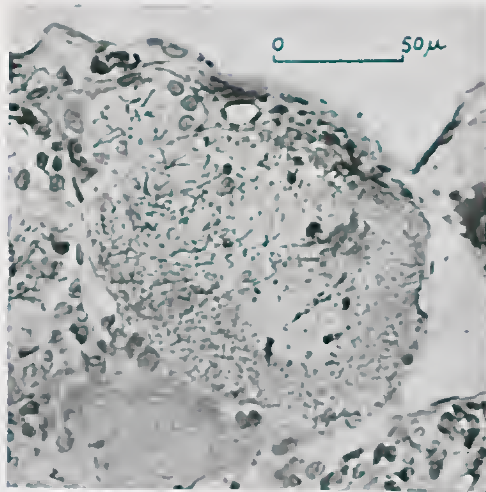


Fig. 3

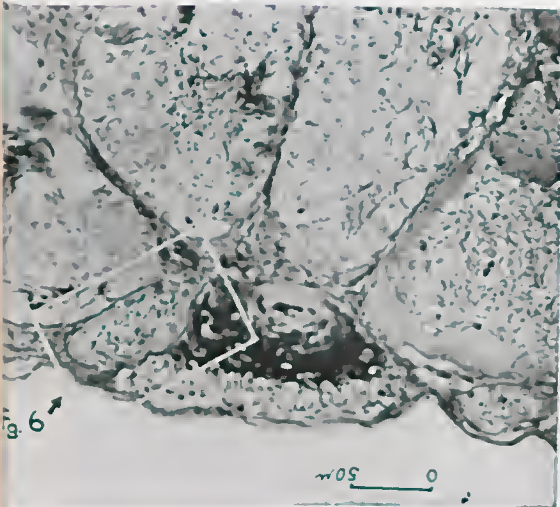


Fig. 4

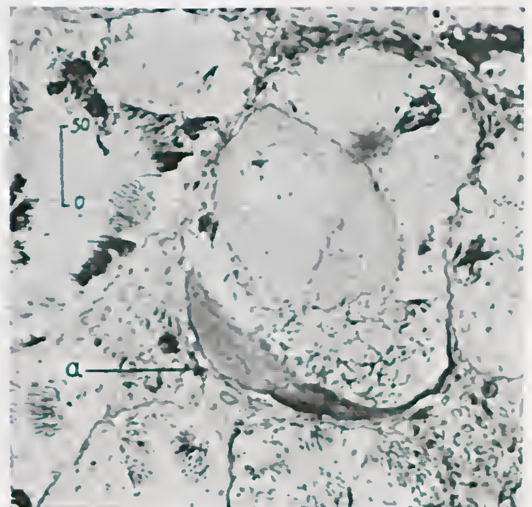
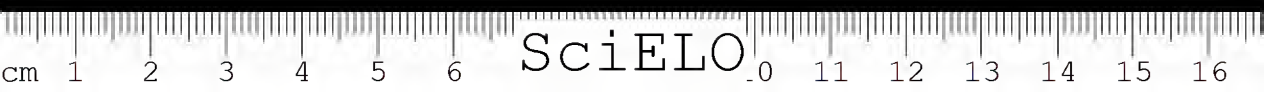


Fig. 5


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
11 12 13 14 15 16

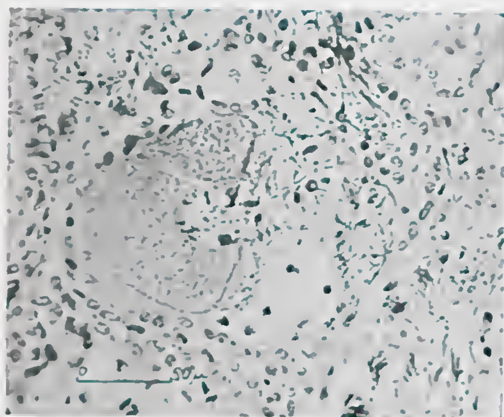


Fig. 11

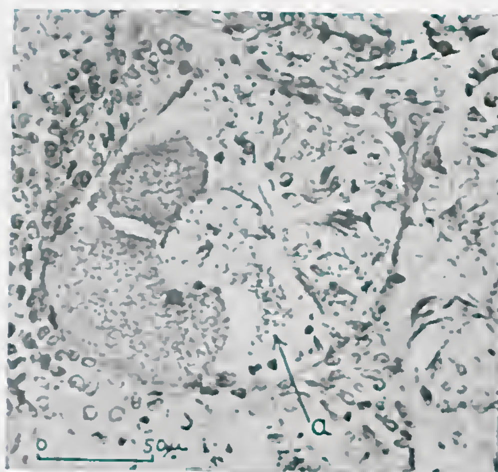


Fig. 12

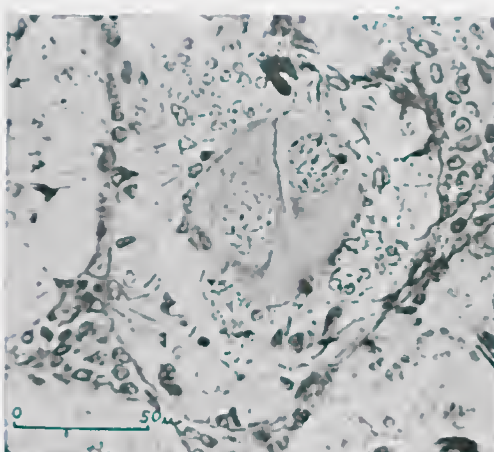


Fig. 13

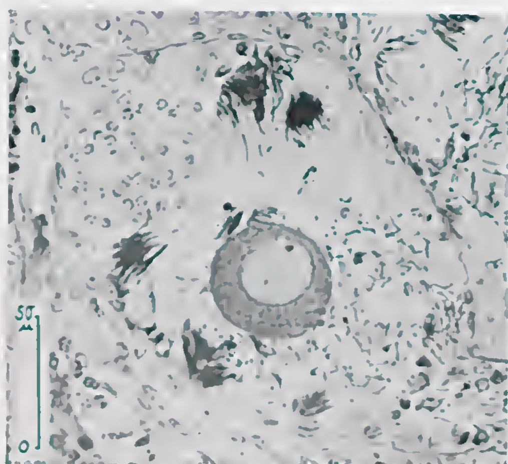


Fig. 14

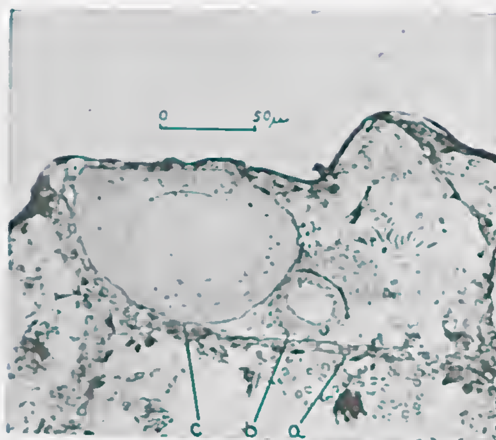
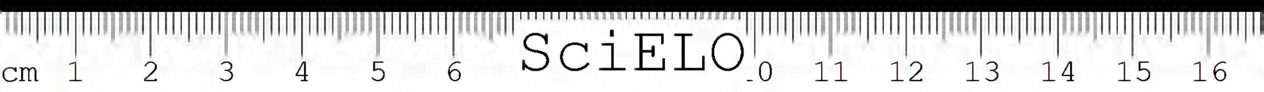


Fig. 15


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

595.44:981

UM GENERO E SETE ESPECIES NOVAS DE ARANHAS

POR

C. DE MELLO-LEITÃO

No ultimo lote de aranhas dos Estados de São Paulo, Santa Catharina e Rio Grande do Sul, que me foram enviadas para estudo pelo Instituto Butantan, havia um genero novo e sete especies que passo a descrever:

Fam. ACTINOPODIDAE

Gen. **Actinopus** PERTY, 1833

Actinopus trinotatus, sp. n.

♀ — 20 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	5	6	3	1.5	15,5 mm.
II	5	6	3	1.7	15,7 mm.
III	5.5	5.5	3	1.5	15,5 mm.
IV	6,5	6,5	4	1,8	18,8 mm.

Cephalothorace liso e brilhante, de região cephalica muito elevada. Olhos anteriores em fila levemente procurva, os medios quasi duas vezes menores do que os lateraes, separados um do outro cerca de dois diametros e quasi tres vezes mais distantes dos lateraes. Olhos medios posteriores elipticos, subcontiguos aos lateraes e situados um pouco adiante dos mesmos. Rastello muito robusto, em uma apophyse interna, saliente, formado de numerosos espinhos conicos, curtos e fortes. Cheliceras com seis robustos dentes em cada margem do sulco ungueal. Peça labial soldada ao esterno, muito mais longa do que larga, afilando-se para o apice; tanto ella como as ancas dos palpos, com areas densamente cuspulosas. Esterno sem sigillas. Patas dos dois primeiros pares com espinhos curtos, muito numerosos, nas faces lateraes e inferior das tibias, pro-

tarsos e tarsos; nas patas do terceiro par, as tibias apresentam apenas fracos espinhos apicilares e os protarsos apresentam numerosos espinhos curtos dorsaes e lateraes; nas patas posteriores sò os tarsos são densamente espinhosos.

Colorido geral castanho escuro; o cephalothorace apresenta tres manchas testaceas: uma mediana, na borda anterior do clypeo; e duas atrás da região ocular, nos sulcos que limitam a região cephalica. Esterno e ancas mais claras.

Hab.: Lagoa do Norte, Santa Catharina.

Typo: No. 289, na collecção do Instituto Butantan.

Fam. DIPLURIDAE

Fam. **Diplura** C. Koch, 1850

Diplura dolichosterna, sp. n.

(Fig. 1)

♂ — 12 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	6	7,5	5	3,8	22,3 mm.
II	6	?	?	?	?
III	5	6	6	4	21 mm.
IV	7	9	7,5	4,5	28 mm.

Cephalothorace baixo, de fovea thoracica quasi direita. Comoro ocular muito elevado, pouco mais longo do que alto. Olhos anteriores grandes, em linha fortemente procurva, os medios circulares e um pouco maiores. Olhos medios posteriores contiguos aos lateraes. Peça labial muito mais larga do que longa, sem espinulos apicilares. Esterno muito estreito, cerca de tres vezes mais longo do que largo. Todos os tarsos flexuosos e delgados. Patas muito espinhosas, com os espinhos dispostos sem ordem; tarsos I e II, com tres ou quatro pequenos espinhos; tarsos III e IV, com espinhos mais abundantes. Ancas dos palpos sem lyra. Fiandeiras iguaes á metade do comprimento do abdome, com os tres segmentos iguaes, pouco afastados na base.

Cephalothorace pardo-escuro, vestido de curta pubescencia sedosa clara. Abdome negro, com abundante pubescencia sedosa, longa, flava. Esterno e ancas. de colorido pardo-escuro; peça labial ainda mais escura. Cheliceras castanho-escuras.

Hab.: Lagoa do Norte, Santa Catharina.

Typo: No. 298, na collecção do Instituto Butantan.

Gen. **Prosharmonicon**, g. n.

Cephalotorax humilis valde recurva. Tuber oculorum saltem duplo latius quam longius, a margine frontali spatium oculum lateralem circiter aequanti sejunctum. Oculi antici magni, inter se anguste et aeque distantes, lineam valde procurvam formantes, medii evidenter minores. Medii postici parvi, angulosi, alteralibus posticis sejuncti.Laterales antici et postici inter se vix separati, hi paulo minores. Pars labialis convexa, haud latior quam longior, mutica. Coxae pedum maxillarium, prope basin, area parva parce et minute spinulosa munitae, lyra ex setis claviformibus duodecim armatae. Pedes (IV, I, II, III) longi et graciles, tarsis flexuosis ut in *Diplura*. Mamillae superiores abdomine haud breviores, articulis tribus subaequis. Mamillae inferiores spatio diametro mamillae triplo latiore a sese distantes. *Typus*:

Prosharmonicon maculatum, sp. n.

♀ — 15 mm. (sem as fiandeiras)

Abdome: 8 mm.. Fiandeiras superiores: 8 mm..

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	5,5	7	4	3	19,5 mm.
II	5	6,5	3,5	2,5	17,5 mm.
III	5,5	4,5	3,5	2,5	16 mm.
IV	5,5	7	5,2	3	20,7 mm.

Esterno com as sigillas anteriores não unidas na linha mediana; as sigillas posteriores circulares e separadas da margem lateral cerca de um diametro. Cheliceras com a margem externa do sulco ungueal inerme e a interna com sete dentes dispostos em dois grupos: o apicilar de quatro, com o dente proximal muito menor, e o basilar de tres, com o dente distal pequeno e bem separado do pequeno dente do grupo apicilar. Olhos lateraes anteriores quasi duas vezes maiores do que os lateraes posteriores.

Cephalothorace côr de mogno claro; patas e palpos pardos com pelos trigueiros. Cheliceras fulvo-escuras, quasi negras. Esterno pardo com abundantes cerdas erectas negras. Peça labial e ancas dos palpos e das pernas de colorido igual ao do cephalothorace. Abdome quasi negro, com quatro pares de faixas obliquas para fora e para trás, formadas por filas de pequenas manchas claras. Ventre castanho-escuro uniforme.

Hab.: Lagoa do Norte, Santa Catharina.

Typo: No. 237, na collecção do Instituto Butantan.

Fam. LYCOSIDAE

Gen. **Lycosa** LATREILLE, 1804

Lycosa thoas, sp. n.

(Figs. 2, 3)

♀ — 24 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	9	12	7,8	5	33.8 mm.
II	8,8	11.5	7.5	4,5	32.3 mm.
III	8	10	7.5	4	29.5 mm.
IV	11	13	10.5	5,5	40 mm.

Cephalothorace pouco elevado. Area dos olhos dorsaes de largura quasi duas vezes maior do que o comprimento, os olhos II maiores. Olhos anteriores relativamente grandes, em fila levemente procurva, equidistantes, separados um diametro. Clypeo proclive e levemente concavo, mais alto do que o diametro dos olhos anteriores. Face baixa duas vezes mais larga do que alta, de lados muito obliquos. Cheliceras com a face posterior rugosa; borda inferior com tres robustos dentes e a superior com tres, dos quaes o medio é duas vezes mais robusto do que os outros. Tibias I e II com 2-2-2 espinhos inferiores; protarsos densamente escopulados até a base, com dois espinhos basilares inferiores e 1 externo.

Cephalothorace castanho escuro, denegrido, com estreita faixa amarella de cada lado, quasi marginal. Cheliceras, palpos, peça labial, esterno, ancas e patas do mesmo colorido do cephalothorace. Abdome castanho-negro uniforme.

Hab.: Alfredo Chaves, Rio Grande do Sul.

Typo: No. 294, na collecção do Instituto Butantan.

Fam. CTENIDAE

Gen. **Neoctenus** SIMON, 1897

Neoctenus eximius, sp. n.

(Fig. 4)

♀ — 8 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	4,5	5.5	3.5	2.2	15,7 mm.
II	4.5	5,5	3.5	2,2	15.7 mm.
III	4	4	3	2.3	13.3 mm.
IV	5.5	6	5,5	2.3	19.3 mm.

Cephalothorace mediocremente elevado, de região cephalica ao mesmo nivel da thoracica, os olhos posteriores mui levemente pedunculados. Olhos anteriores em linha direita, iguaes e equidistantes. Olhos posteriores formando um trapezio de base posterior, muito mais largo do que longo, os quatro olhos iguaes, os anteriores separados por uma distancia quasi igual á extensão da fila anterior. Tibias I e II com espinhos longos, fracos, semi-erectos, na face inferior, sendo quatro internos e tres externos; protarsos com 2-2 espinhos inferiores, semelhantes, e com densas escopulas.

Cephalothorace pardo-denegrido, com larga faixa longitudinal mediana esbranquiçada, que vae da borda posterior até o meio da area dos olhos posteriores. De cada lado, junto ás margens, ha uma estreita faixa sinuosa pouco nitida. Cheliceras denegridas com tres faixas fulvas, sendo a externa muito nitida e as duas outras indecisas. Patas denegridas com os femures ornados de duas estreitas faixas claras. Ancas testaceas, com abundante pontilhado negro, semelhante ao das ancas e com larga faixa longitudinal mediana negra. Peça labial denegrida de ponta clara. Laminas maxillares testaceas, lavadas de fusco. Abdome cinzento-negro, com uma larga faixa mediana longitudinal branca; ventre cinzento-negro uniforme.

Hab.: Casa Branca, S. Paulo.

Typo: No. 295, na collecção do Instituto Butantan.

Fam. CLUBIONIDAE

Gen. **Corinna** C. KOCH, 1842

Corinna tridentina, sp. n.

(Fig. 5)

♀ — 15 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	6.2	8,5	4,5	3,3	22,5 mm.
II	6	8	4.5	3,3	21,8 mm.
III	6,5	7	5	3,5	22 mm.
IV	7	8,5	7,5	3.5	26,5 mm.

Cephalothorace relativamente pouco elevado e mediocremente convexo, revestido de curta pubescencia sedosa deitada. Olhos posteriores em fila procurva, iguaes, os medios separados menos de dois diametros e a mais de dois diametros dos lateraes. Olhos anteriores em fila levemente procurva, os medios bem

maiores, equidistantes, separados cerca de um diametro dos medios. Area dos olhos medios bem mais longa do que larga, parallela, os olhos anteriores quasi duas vezes maiores. Esterno de rebordo pouco notavel. Peça labial pouco mais longa do que larga, de borda livre direita. A margem inferior do sulco ungueal armada de seis robustos dentes. Tibias I e II com 2-2-2-2-2 espinhos inferiores e protarsos com 2-2.

Cephalothorace e cheliceras de colorido fulvo-negro, bem como a peça labial, as laminas maxillares, as patas e os palpos. Esterno e ancas côr de mogno. Abdome de dorso castanho uniforme, sem escudo basilar; ventre pardo.

Hab.: Araguary, Minas Geraes.

Typo: No. 292, na collecção do Instituto Butantan.

Fam. ANYPHAENIDAE

Gen. Teudis Cambridge, 1896

Teudis hirsutus, sp. n.

(Figs. 6, 7)

♂ — 7,5 mm.

Patas	Femur	Patella-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	4,5	6,8	4,7	1,5	17,5 mm.
II	4	5,8	3,2	1,8	14,8 mm.
III	3	3,5	3,2	1,5	11,2 mm.
IV	4,5	5,5	6	1,5	17,5 mm.

Cephalothorace pouco estreitado adiante. Olhos posteriores em fila levemente procurva, iguaes e equidistantes. Olhos anteriores em fila levemente recurva, mais estreita do que a foça posterior, tambem de olhos iguaes e equidistantes. Area dos olhos medios mais alta do que larga, mais estreita adiante. Tibias I e II com 2-2 longos espinhos inferiores e 1-1 lateraes; protarsos com dois longos espinhos basilares e dois outros mais curtos, na face inferior e com um de cada lado. Cheliceras robustas, verticaes; a margem inferior do sulco ungueal inerme, a superior com dois pequenos espinhos largamente separados. Peça labial duas vezes mais longa do que larga, excedendo muito o meio das laminas, que são longas e dilatadas no apice.

Cephalothorace e patas amarello-testaceos, as patas com longos pêlos semi-erectos, acinzentados. Cheliceras, peça labial e laminas maxillares fulvo-claras.

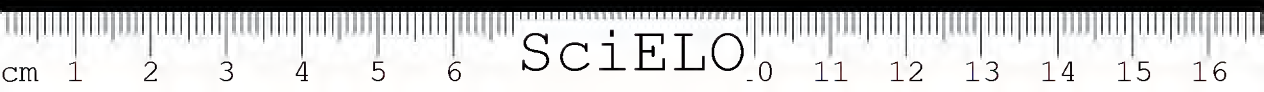
Esterno amarello sulfureo. Abdome testaceo, de tons levemente avermelhados, côr de tijolo.

Hab.: Corumbatahy, S. Paulo.

Typo: No. 246, na collecção do Instituto Butantan.

(Trabalho de collaboração do Museu Nacional, Rio, recebido em outubro de 1937. Dado a publicidade em dezembro de 1937).




cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16

Mem. Inst. Butantan
Vol. XI — 1937



Fig. 1 — Palpo de *Diplura dolichosterna*, sp. n.

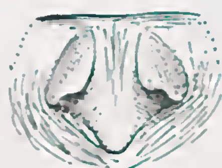


Fig. 2 — Epigyno de *Lycosa thoas*, sp. n.

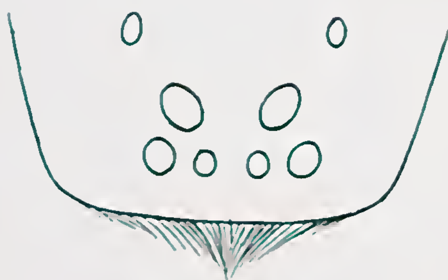


Fig. 3 — Disposição ocular de *Lycosa thoas*, sp. n.



Fig. 4 — Epigyno de *Neoctenus eximius*, sp. n.

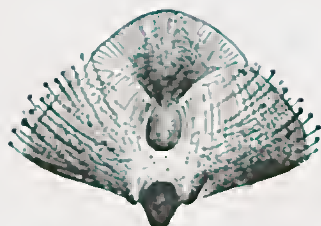


Fig. 5 — Epigyno de *Corinna tridentina*, sp. n.

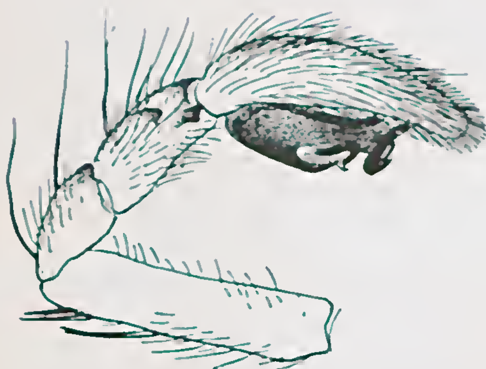


Fig. 6 — Palpo de *Teudis hirsutus*, sp. n. (face externa)



Fig. 7 — Palpo de *T. hirsutus*, sp. n. (face ventral)


cm 1 2 3 4 5 6 SciELO 10 11 12 13 14 15 16


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15


SciELO


cm 1 2 3 4 5 6
SciELO
10 11 12 13 14 15



Empresa Graphica da
REVISTA DOS TRIBUNAES
Rua Xavier de Toledo, 72
São Paulo-Brasil — 1938